

Patrícia Andreia Leite da Silva Porto

Estudo da Actividade Antioxidante de  
Catequinas e Procianidinas Oligoméricas



Departamento de Química  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto  
Outubro / 2002

Patrícia Andreia Leite da Silva Porto

Estudo da Actividade Antioxidante de  
Catequinas e Procianidinas Oligoméricas



Departamento de Química  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto  
Outubro / 2002

**— AGRADECIMENTOS —**

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de algumas pessoas e entidades que contribuíram de forma relevante para a execução do mesmo, daí que não poderia deixar de prestar um agradecimento sincero:

- ao Prof. Doutor Victor de Freitas do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, que me orientou no decurso de todo o trabalho sempre com o máximo de profissionalismo, disponibilidade e dedicação;
- ao Centro de Investigação em Química, pela oportunidade de realizar este trabalho;
- ao Prof. Doutor João Laranjinha, à Prof. Doutora Leonor Almeida e a toda a equipa de trabalho do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela colaboração e especialmente pela simpatia e amabilidade com que me receberam;
- ao Prof. Doutor Manuel Paula-Barbosa e à equipa de trabalho do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto pela importante colaboração neste trabalho e pela sua receptividade;
- à Liga dos Amigos da Saúde e do Vinho (LASVIN), e em especial ao Dr. Tenreiro por ter lançado o mote para este estudo;
- aos meus colegas de trabalho do Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, nomeadamente à Sandra Lourenço, Nélia Fortunato, Elisabete Carvalho, Nuno Mateus e João Pissarra, com os quais aprendi imenso e que me proporcionaram momentos únicos de boa disposição;
- às restantes pessoas do Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto com as quais convivi e integraram a minha equipa, nomeadamente a Dra. Adelina Vieira e Doutor Steven Rogerson;
- Aos meus Pais, Irmão, e Amigos que me felicitaram nos momentos de sucesso e me apoiaram nos momentos mais difíceis;
- Ao Hugo por toda a compreensão e carinho.

— RESUMO —

## Resumo

Este trabalho engloba o estudo da actividade antioxidante de catequinas e procianidinas oligoméricas (3-flavanóis) tanto *in vitro*, no qual se estabeleceu uma relação entre o efeito antioxidante destes compostos e a sua estrutura molecular, como *in vivo*, ao nível da sua acção preventiva face ao envelhecimento cerebral induzido pelo etanol.

Na primeira parte do trabalho os 3-flavanóis foram sintetizados ou extraídos de grainhas de uvas e purificados através de um complexo e moroso tratamento cromatográfico, tendo-se obtido os seguintes compostos com um elevado grau de pureza: os monómeros (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-3-O-galato; as procianidinas diméricas do tipo C4-C8 (B1, B2, B3 e B4) e respectivos análogos do tipo C4-C6 (B5, B6, B7 e B8), o dímero B2-3''-O-galato; os trímeros C1 e T1.

O estudo da actividade antioxidante dos 3-flavanóis *in vitro* (Parte 2) envolveu um modelo experimental constituído por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humanas que foram submetidas a um processo de oxidação controlado. Avaliou-se o efeito antioxidante destes polifenóis, mais precisamente a sua capacidade de neutralizar radicais livres de oxigénio (RLO) face a diferentes etapas da reacção de oxidação das LDL (iniciação e propagação). A fase inicial da oxidação foi avaliada através da fluorescência de uma sonda altamente sensível, o ácido *cis*-parinárico (*cis*-PnA), incorporado na membrana das LDL e a etapa de propagação foi analisada pela monitorização da formação de hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas e pelo consumo de oxigénio. Os resultados do estudo da influência da estrutura molecular das procianidinas diméricas na sua acção antioxidante sugerem que: i) o tipo de ligação interflavonoide (C4-C6 e C4-C8) estabelecida entre as unidades monoméricas (C4-C8 ou C4-C6) exerce um efeito significativo na capacidade que estes compostos têm de neutralizar os radicais livres, apresentando os dímeros C4-C6 uma acção mais significativa na fase de iniciação e os dímeros C4-C8 um efeito antioxidante mais acentuado na fase de propagação da oxidação das LDL; ii) o grau de polimerização das procianidinas induz um aumento da sua capacidade antioxidante, mas apenas nos compostos constituídos pela mesma unidade monomérica, (-)-epicatequina (epi), dímero B2 (epi-epi) e trímero C1 (epi-epi-epi); iii) a galoilação aumenta a actividade antioxidante dos 3-flavanóis, especialmente no caso do dímero B2-3''-O-galato, o qual se revelou o antioxidante mais eficiente. Adicionalmente, as procianidinas diméricas exerceram efeitos distintos dependendo da etapa de oxidação em causa. Os dímeros C4-C8 (B1 a B4) não induziram qualquer período de inibição ( $t_i$ ) na etapa

de iniciação da oxidação das LDL (método do *cis*-parinário), diminuindo apenas a velocidade de oxidação, sendo que na etapa de propagação (consumo de oxigénio e formação de dienos conjugados) já se verificou um período de indução. Pelo contrário os restantes 3-flavanóis (dímeros C4-C6, monómeros, trímeros C1 e T1, B2-3''-O-galato e (-)-epicatequina-galato) apresentaram um período de indução em ambas as etapas da oxidação. Estes resultados sugerem que os 3-flavanóis estudados interactuam de forma distinta com os radicais peroxilo hidrofílicos (fase de iniciação) e com os radicais peroxilo de origem lipídica (fase de propagação). A conformação adoptada pelas diferentes procianidinas diméricas em solução e que influencia as suas propriedades hidrofílicas poderão, por um lado, afectar de modos diferentes para cada isómero a sua capacidade de ligação à componente lipídica das lipoproteínas, e por outro lado, o tipo de conformação adoptada por cada dímero poderá afectar a sua interacção com os radicais livres peroxilo presentes na fase aquosa (etapa de iniciação) e na membrana das LDL (etapa de propagação).

Na Parte 3 do trabalho avaliou-se o efeito antioxidante de um extracto de grainhas constituído essencialmente por catequinas e procianidinas oligoméricas a nível cerebral pela quantificação de lipofuscina nos neurónios da sub-divisão CA3 do hipocampo de ratos. Os resultados sugerem que as catequinas e procianidinas oligoméricas quando administradas numa solução etanólica previnem a deposição anormal de lipofuscina induzida pelo etanol. Este facto pode ter várias explicações: a) o etanol facilita a absorção destes compostos pela ruptura de células intestinais; b) os 3-flavanóis apresentam uma maior solubilidade em solução alcoólica o que pode favorecer a sua absorção a nível intestinal; c) as catequinas e procianidinas apenas exercem um efeito inibidor numa situação de dano celular, como o induzido pelo etanol. Analisou-se também a capacidade antioxidante total do plasma (TRAP) dos animais por monitorização do consumo de oxigénio, mas não se obtiveram diferenças significativas entre os grupos estudados.

## Abstract

This work included the study of the antioxidant activity of catechins and oligomeric procyanidins (3-flavanols) on both *in vitro* conditions, in which it has been tried to establish a relationship between antioxidant effect of these compounds and their molecular structure, and *in vivo* conditions involving their preventive action upon ethanol-induced aging of the brain.

Firstly, 3-flavanols were synthesized or extracted from grape seeds and purified by different chromatographic techniques, resulting in the following high pure compounds: monomers (+)-catechins, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate; dimers C4-C8 (B1-B4) and respective analogues C4-C6 (B5-B8) and B2-3''-O-gallate; trimers C1 and T1.

The study of antioxidant activity of 3-flavanols *in vitro* (Part 2) involved an experimental model consisting of human low density lipoproteins (LDL) submitted to a controlled oxidation process. The antioxidant effect, more precisely, the radical trapping capacity of these polyphenols was evaluated at different stages of LDL oxidation (initiation and propagation). The initial event of oxidation was evaluated by means of the fluorescence quenching of a highly sensitive probe, *cis*-parinaric acid (*cis*-PnA), incorporated at the LDL membrane, and propagation stage was analyzed by monitoring conjugated dienes formation and oxygen consumption. The results concerning the influence of molecular structure of 3-flavanols on their antioxidant action suggest that: i) interflavan linkage type (C4-C6 or C4-C8) established between monomeric units exerts a significant effect upon free radical trapping capacity showing that procyanidins dimers C4-C6 (B6 to B8) presented a more powerful antioxidant effect in initial step while C4-C8 procyanidins dimers a more pronounced effect in propagation phase of LDL oxidation; ii) polymerization of 3-flavanols induce an increase of antioxidant capacity, but only for the compounds containing the same monomeric unit, (-)-epicatechin (epi), dimer B2 (epi-epi) and trimer C1 (epi-epi-epi); iii) galloylation increase antioxidant activity of 3-flavanols, specially in the case of B2-3''-O-gallate, which revealed the maximal trapping efficiency.

Additionally, procyanidins show to have different effects depending on the oxidation stage. dimers C4-C8 (B1-B4) didn't induce any inhibition period ( $t_i$ ) in initiation stage of LDL oxidation, but only reduced oxidation rate, whereas in propagation phase (oxygen consumption and conjugated dienes formation) there was an inductive period. Oppositely, the remaining 3-flavanols (dimers C4-C6, monomers, trimers C1 and T1, (-)-epicatechin-3-O-gallate and B2-3''-O-gallate) induced an inhibition period in both oxidation stages. These

results suggest that 3-flavanols interact with hydrophilic (initiation) and with hydrophobic (propagation) peroxy radicals in a different way. Conformation adopted by these procyanidins in solution, which influence their hydrophilic properties, could affect dimers capacity to interact with lipidic component of LDL and, on the other hand, the conformation of each procyanidin could affect differently its affinity to peroxy radicals present in aqueous media (initiation) and in LDL membrane (propagation).

In Part 3 of the work it has been studied the antioxidant activity of a grape seed extract composed essentially by catechins and oligomeric procyanidins at the rat brain by lipofuscin quantification on CA3 subdivision of hippocampus. The results suggest that catechins and procyanidins when administrated in ethanolic solution prevent abnormal ethanol-induced lipofuscin deposition. This fact could have different explanations: a) the rupture of intestinal cells promoted by ethanol could increased these polyphenols absorption; b) 3-flavanols have a higher solubility in alcoholic solution, which could promote their intestinal absorption; c) catechins and procyanidins only exert an inhibitory effect in a cellular damage situation, like that induced by ethanol. Total antioxidant capacity of plasma (TRAP) was also studied by monitoring oxygen consumption, but were not detected significant differences among tested groups.

## Résumé

Ce travail concerne l'étude de l'activité antioxydante des catéchines et des procyanidines oligomériques (3-flavanols) autant *in vitro*, dans lequel on a cherché à établir une liaison entre l'effet antioxydant de ces composés et leur structure moléculaire, comme *in vivo*, au niveau de leur action préventive face au vieillissement cérébral provoquer par l'alcool.

Dans la première partie de ce travail, les 3-flavanols ont été synthétisées ou extrait directement des pépins de raisins et purifiés par des différentes techniques chromatographiques. Les composés suivants ont été obtenus avec un haut degré de pureté: les monomères (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et (-)-épicatéchine-3-O-gallate; les dimères C4-C8 (B1-B4), C4-C6 (B5-B8) et B2-3''-O-gallate; les trimères C1 et T1.

L'étude de l'activité antioxydante des 3-flavanols *in vitro* (Part 2) a engagé un model expérimental constitué par des lipoprotéines de faible densité (LDL) humaines qui ont été subis un processus d'oxydation contrôlé. L'effet antioxydant de ces polyphénols, plus précisément de leur capacité pour neutraliser les radicaux livre d'oxygènes (RLO) pendant les différentes étapes de la réaction d'oxydation des LDL (initiation et propagation) a été étudié. La phase initiale de l'oxydation a été évaluée par fluorescence d'une sonde très sensible, l'acide *cis*-parinarique (*cis*-PnA), incorporée dans la membrane des LDL et l'étape de propagation a été analysée par monitorisation de la formation des hydroperoxydes avec double liaison conjuguée et par la consommation de l'oxygène. Les résultats de l'étude de l'influence de la structure moléculaire des 3-flavanols dans leur action antioxydante suggèrent: i) le type de liaison interflavane établie entre les unités monomériques a un effet significatif dans la capacité des 3-flavanols neutraliser les radicaux livre d'oxygènes - les dimères C4-C6 ont une action plus significative dans la phase d'initiation, tandis que les dimères C4-C8 ont un effet antioxydant plus marqué dans la phase de propagation de l'oxydation des LDL; ii) le degré de polymérisation des 3-flavanols induit une augmentation de leur capacité antioxydante, mais seulement pour les composés constitués par la même unité monomérique, (-)-épicatéchine, dimère B2 et trimère C1; iii) la présence d'un groupe galloyl augmente l'activité antioxydante des 3-flavanols, spécialement dans le cas du dimère B2-3''-O-gallate, lequel est démontré être l'antioxydant le plus efficient. En plus, les 3-flavanols ont de différents effets selon les étapes d'oxydation en cause. Les dimères C4-C8 (B1 a B4) n'induisent aucune période d'induction (ti) dans l'étape d'initiation d'oxydation des LDL (méthode *cis*-parinarique), réduisant seulement la vitesse d'oxydation, tandis que dans l'étape

de propagation (formation des diènes conjugués et consommation de l'oxygène) on observe une période d'induction. Par ailleurs, les autres 3-flavanols (dimères C4-C6, monomères, trimères C1 et T1 et ésters-gallate) présentent une période d'induction dans les deux étapes d'oxydation. Ces résultats suggèrent que les 3-flavanols interagissent de différentes façons avec les radicaux peroxyde hydrophiliques (phase d'initiation) et avec les radicaux peroxyde d'origine lipidique (phase de propagation). La conformation adoptée par les différents isomères des procyanidines dimères (B1-B8) en solution et qui influence leurs propriétés hydrophiliques peuvent, d'une part, affecter de façon différente pour chaque isomère leur capacité pour se lier à la partie lipidique des lipoprotéines et, d'autre part, les conformères adoptés par chaque procyanidine peuvent affecter leur interaction avec les radicaux libres peroxyde présents dans la phase aqueuse (étape d'initiation) et dans la membrane des LDL (étape de propagation).

La troisième partie de ce travail concerne l'étude de l'effet antioxydant d'un extrait de pépin de raisin, constitué essentiellement par un mélange de catéchines et procyanidines oligomères, au niveau cérébral par la quantification de lipofuscine dans les neurones de la sub-division CA3 du hippocampe des rats. Les résultats suggèrent que les catéchines et procyanidines oligomères ingérés en solution éthanolique préviennent la déposition anormale de lipofuscine induite par l'éthanol, contrairement à ce qu'on observe en solution aqueuse. Ce fait peut avoir plusieurs explications: a) l'éthanol facilite l'absorption de ces composées par la rupture de cellules intestinales; b) les 3-flavanols sont plus solubles en solution alcoolique, ce qui peut aider à leur absorption au niveau intestinal; c) les catéchines et procyanidines dimères exercent seulement un effet inhibiteur significatif dans une situation de dommage cellulaire, comme celui induit par l'éthanol.

La capacité antioxydante totale du plasma (TRAP) des animaux a été également mesurée par la méthode de monitorisation de la consommation d'oxygène, mais les différences entre les groupes des animaux étudiés ne sont pas significatives.

— ÍNDICES —

---

<b>Índice Geral</b>	
Índice de figuras.....	16
Índice de tabelas.....	21
Lista de abreviaturas e símbolos.....	24
Objectivos.....	27
Introdução geral.....	29
1- Os compostos polifenólicos.....	29
1.1- As catequinas.....	31
1.2- As procianidinas.....	32
1.3- As prodelphinidinas.....	34
1.4- Taninos hidrolisáveis.....	35
2- Ocorrência e biodisponibilidade dos 3-flavanóis.....	36
3- Propriedades físico-químicas dos polifenóis e seus efeitos biológicos.....	37
3.1- Interação dos polifenóis com proteínas.....	37
3.2- Complexação entre polifenóis e iões metálicos.....	39
3.3- Neutralização de radicais livres de oxigénio pelos polifenóis.....	39
4- Acção antioxidante dos polifenóis.....	42
5- Os Polifenóis e a prevenção de doenças cardiovasculares.....	42
6- Os Polifenóis e a prevenção do cancro.....	44
7- Os Polifenóis como agentes antimicrobianos.....	45
Parte 1- Obtenção de 3-Flavanóis.....	47
Capítulo 1- Extracção e Isolamento de 3-Flavanóis de Grainhas de Uva.....	48
1- Introdução.....	48
2- Material e Métodos.....	50
2.1- Extracção dos polifenóis das grainhas de uva.....	50

---

2.2- Precipitação selectiva das procianidinas oligoméricas com hexano .....	50
2.3- Purificação das catequinas e procianidinas oligoméricas por cromatografia.....	52
2.3.1- Fraccionamento por cromatografia líquida em gel Toyopearl.....	52
2.3.2- Isolamento das procianidinas oligoméricas por HPLC-semipreparativa.....	52
2.3.3- Separação dos dímeros B1 e B3 por HPLC-semipreparativa .....	53
2.3.4- Purificação por cromatografia líquida em gel Toyopearl .....	53
3- Resultados e Discussão .....	54
 Capítulo 2- Síntese de Procianidinas Naturais.....	 60
1- Introdução .....	60
2- Material e Métodos .....	64
2.1- Síntese de procianidinas usando a (-)-epicatequina como unidade superior .....	64
2.1.1- Acetilação .....	64
2.1.2- Bromação .....	64
2.1.3- Condensação .....	64
2.1.4- Desacetilação.....	65
2.2- Isolamento dos oligómeros sintetizados .....	65
3- Resultados e Discussão .....	66
 Parte 2- Estudo <i>in vitro</i> da Actividade Antioxidante das Catequinas e Procianidinas Oligoméricas face à Oxidação das LDL Humanas .....	 70
1- Introdução .....	70
1.1- As lipoproteínas.....	71
1.1.1- Biossíntese das lipoproteínas .....	71
1.1.2- Composição das LDL .....	73
1.2- A oxidação das LDL.....	74
1.2.1- Desenvolvimento de arteriosclerose.....	74

---

1.2.2- Mecanismo e produtos da autoxidação das LDL .....	75
1.2.3- Mecanismos biológicos de prevenção da oxidação das LDL .....	79
1.3- Métodos de análise da actividade antioxidante dos polifenóis .....	82
1.3.1- Modelo fluorimétrico utilizando o ácido <i>cis</i> -parinárico ( <i>cis</i> -PnA) .....	83
1.3.2- Medição dos dienos conjugados .....	84
1.3.3- Medição do consumo de oxigénio .....	85
2- Material e Métodos .....	86
2.1- Isolamento das LDL .....	86
2.2- Determinação do conteúdo proteico das LDL isoladas .....	87
2.3- Determinação da actividade antioxidante das catequinas e procianidinas oligoméricas .....	88
2.3.1- Monitorização da fluorescência do ácido <i>cis</i> -parinárico .....	88
2.3.2- Monitorização da formação dos dienos conjugados .....	90
2.3.3- Monitorização do consumo de oxigénio .....	91
3- Resultados e Discussão .....	93
3.1- Oxidação do ácido <i>cis</i> -parinárico (método fluorimétrico) .....	93
3.2- Medição dos dienos conjugados e do consumo de oxigénio .....	95
4- Conclusões .....	97
Parte 3- Estudo <i>in vivo</i> da Actividade Antioxidante das Catequinas e Procianidinas Oligoméricas .....	
1- Introdução .....	102
1.1- Deposição de lipofuscina no cérebro .....	103
1.2- Capacidade antioxidante total do plasma .....	104
2- Material e Métodos .....	110
2.1- Animais e Dieta .....	110
2.2- Composição do extracto polifenólico .....	110

---

2.3- Deposição de lipofuscina no cérebro.....	111
2.4- Capacidade antioxidante total do plasma.....	112
3- Resultados e Discussão .....	114
3.1- Deposição de lipofuscina no cérebro.....	114
3.2- Capacidade antioxidante total do plasma.....	120
3.3- Influência dos 3-flavanóis na alimentação e peso dos animais.....	122
3.3.1- Efeito do tratamento com 3-flavanóis.....	123
3.3.1.1- Efeito do tratamento com 3-flavanóis na ração ingerida.....	123
3.3.1.2- Efeito do tratamento com 3-flavanóis na bebida ingerida.....	124
3.3.1.3- Efeito do tratamento com 3-flavanóis no peso .....	125
3.3.2- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis.....	127
3.3.2.1- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis na ração ingerida.....	127
3.3.2.2- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis na bebida ingerida.....	128
3.3.2.3- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis no peso.....	129
4- Conclusões.....	131
Conclusão geral.....	134
Lista de referências bibliográficas .....	136

## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Estrutura e sistema de numeração do núcleo flavânico .....	30
<b>Figura 2-</b> Classificação dos principais grupos de flavonóides.....	30
<b>Figura 3-</b> Estrutura das catequinas abundantes na natureza .....	31
<b>Figura 4-</b> Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B .....	32
<b>Figura 5-</b> Estrutura de procianidinas diméricas do tipo A.....	33
<b>Figura 6-</b> Estrutura de procianidinas esterificadas com o ácido gálico (B2-3''-O-galato).....	33
<b>Figura 7-</b> Estrutura de procianidinas triméricas do tipo C .....	34
<b>Figura 8-</b> Estrutura de prodelfinidina.....	35
<b>Figura 9-</b> Estrutura de um tanino hidrolisável .....	35
<b>Figura 10-</b> Energética da redução do oxigénio a 25°C e pH 7.0.....	40
<b>Figura 11-</b> Esquema do isolamento das procianidinas oligoméricas por precipitação selectiva com hexano (PP- precipitado). .....	51
<b>Figura 12-</b> Cromatograma de baixa pressão (gel Toyopearl) referente ao fraccionamento das procianidinas oligoméricas extraídas de grainhas de uva.....	54
<b>Figura 13-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F1 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna.....	56
<b>Figura 14-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F2 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna .....	56
<b>Figura 15-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F3 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna .....	56
<b>Figura 16-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F4 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna .....	57
<b>Figura 17-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F5 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna .....	57

<b>Figura 18-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F6 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna .....	57
<b>Figura 19-</b> Cromatograma de HPLC-semipreparativa da subfracção B1/B3 isolada a partir da fracção F4. ....	58
<b>Figura 20-</b> Mecanismo da reacção de acetilação dos monómeros de (-)-epicatequina (R, grupo acetilo). ....	60
<b>Figura 21-</b> Mecanismo da reacção de bromação da (-)-epicatequina pentacetilada (R, grupo acetilo). ....	61
<b>Figura 22-</b> Mecanismo da reacção de condensação entre o derivado bromado da (-)-epicatequina pentacetilada e a unidade inferior (+)-catequina pentacetilada (R, grupo acetilo) .....	62
<b>Figura 23-</b> Reacção de desacetilação do dímero B1 acetilado (R, grupo acetilo). ....	63
<b>Figura 24-</b> Cromatograma (gel TSK Toyopearl) referente ao fraccionamento das procianidinas sintetizadas .....	66
<b>Figura 25-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F4 correspondente aos dímeros do tipo C4-C8 sintetizados .....	67
<b>Figura 26-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F5 correspondente aos dímeros do tipo C4-C6 sintetizados .....	67
<b>Figura 27-</b> Cromatograma de HPLC da fracção F6 correspondente aos trímeros sintetizados .....	68
<b>Figura 28-</b> Modelo esquemático de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Stryer, 1995). ....	73
<b>Figura 29-</b> Mecanismos de oxidação das LDL e desenvolvimento de arteriosclerose (Steinberg <i>et al.</i> , 1989). ....	75
<b>Figura 30-</b> Mecanismo geral da peroxidação lipídica (LH, ácido gordo insaturado; L <sup>•</sup> , radical alquilo; LOO <sup>•</sup> , radical peróxilo; LOOH, hidroperóxido; In <sup>•</sup> , radical iniciador; InH, forma reduzida do radical iniciador;; AH e A <sup>•</sup> , formas reduzida e oxidada do antioxidante). ....	77
<b>Figura 31-</b> Mecanismo de peroxidação lipídica do ácido linoleico (LH, ácido gordo insaturado; L <sup>•</sup> , radical alquilo (estruturas de ressonância); LOO <sup>•</sup> , radical peróxilo;	

---

LOOH, hidroperóxido com ligações duplas conjugadas; In <sup>•</sup> , radical iniciador; InH, forma reduzida do radical iniciador).....	78
<b>Figura 32-</b> Cinética da oxidação das LDL e evolução da sua composição em termos das espécies reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos, dienos conjugados (Abs 234 nm) e fluorescência a 430 nm.....	79
<b>Figura 33-</b> Mecanismos de inibição da peroxidação lipídica das LDL por acção dos flavonóides (Fl(OH)); Fl(O <sup>•</sup> ), formas reduzida e oxidada do flavonóide; LH, ácido gordo insaturado; L <sup>•</sup> , radical alquilo; LOO <sup>•</sup> , radical peroxilo; LOOH, hidroperóxido). .....	80
<b>Figura 34-</b> Acção antioxidante sinérgica entre o ácido cafeico e as vitaminas E e C na peroxidação lipídica das LDL (E <sup>0</sup> , potencial normal de redução) (R, -CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> H; R', -CH=CHCOOH; R'', -CH(OH)CH <sub>2</sub> OH (adaptado de Laranjinha e Cadenas., 1999). .....	81
<b>Figura 35-</b> Termólise do AAPH.....	83
<b>Figura 36-</b> Estrutura do ácido <i>cis</i> -parinárico ( <i>cis</i> -PnA). .....	84
<b>Figura 37-</b> Evolução da fluorescência do ácido <i>cis</i> -parinárico incorporado nas LDL submetidas a oxidação induzida pelo AAPH em presença e na ausência de antioxidante (ensaio controlo) (a <sub>1</sub> e a <sub>2</sub> , tangentes às curvas de inibição nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente; b <sub>1</sub> e b <sub>2</sub> , tangentes às curvas de propagação da oxidação nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente; t <sub>i</sub> , período de indução; k <sub>ox</sub> , velocidade de oxidação). .....	89
<b>Figura 38-</b> Formação dos dienos conjugados na presença e ausência de antioxidante (controlo) (a <sub>1</sub> e a <sub>2</sub> , tangentes às curvas de inibição da oxidação nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente; b <sub>1</sub> e b <sub>2</sub> , tangentes às curvas de propagação da oxidação nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente; t <sub>i</sub> , período de indução).....	91
<b>Figura 39-</b> Monitorização do consumo de oxigénio na presença e na ausência de antioxidante (a, tangente à curva de inibição da oxidação no ensaio com antioxidante; b, tangente à curva de propagação da oxidação no ensaio com antioxidante; t <sub>i</sub> , período de indução).....	92
<b>Figura 40-</b> Conformação preferencial dos dímeros B6, B2 e B2-3''-O-galato, determinadas usando os parâmetros Allinger's MM2.....	100

---

<b>Figura 41-</b> Monitorização do consumo de oxigénio durante a reacção de oxidação do plasma. a <sub>1</sub> , tangente à curva de inibição da oxidação na presença de antioxidantes endógenos do plasma; b <sub>1</sub> , tangente à curva de propagação da oxidação após esgotamento dos antioxidantes endógenos do plasma; a <sub>2</sub> , tangente à curva de inibição da oxidação na presença de trolox; b <sub>2</sub> , tangente à curva de propagação após esgotamento do trolox (t <sub>i</sub> , período de indução).....	113
<b>Figura 42-</b> Célula da subdivisão CA3 do hipocampo de um animal submetido a tratamento com Água (Grupo A: Controlo) durante 6 meses (seta, grânulo de lipofuscina; cabeça de seta, lisosoma; dupla cabeça de seta, corpo multivesicular; c, célula; N, núcleo).....	114
<b>Figura 43-</b> Célula da subdivisão CA3 do hipocampo de um animal submetido a tratamento com Etanol+CP (Grupo D) durante 6 meses (seta, grânulo de lipofuscina; cabeça de seta, lisosoma).....	115
<b>Figura 44-</b> Célula da subdivisão CA3 do hipocampo de um animal submetido a tratamento com Etanol (Grupo C: Controlo) durante 6 meses (seta, grânulo de lipofuscina; cabeça de seta, lisosoma).....	115
<b>Figura 45-</b> Valor médio e respectivo desvio padrão da densidade volumétrica (Vv %) do citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupada pelos grânulos de lipofuscina nos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) (* p<2x10 <sup>-4</sup> vs. Etanol) (CP- catequinas e procianidinas).....	118
<b>Figura 46-</b> Valor médio e respectivo desvio padrão do volume de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupado pelos grânulos de lipofuscina nos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) (* p<2x10 <sup>-4</sup> , ** p<3x10 <sup>-4</sup> vs. Etanol) (CP- catequinas e procianidinas).....	119
<b>Figura 47-</b> Valor médio e respectivo desvio padrão do parâmetro TRAP dos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas).....	122
<b>Figura 48-</b> Valor médio da quantidade de ração ingerida/animal/dia pelos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) durante o tratamento (6 meses) e respectivo desvio padrão. * p<2x10 <sup>-4</sup> , ** p<5x10 <sup>-3</sup> vs. Água; ° p<2x10 <sup>-4</sup> vs. Água+CP (CP- catequinas e procianidinas).....	124

**Figura 49-** Valor médio da quantidade de bebida ingerida/animal/dia pelos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) durante o tratamento (6 meses) e respectivo desvio padrão. \*  $p < 2 \times 10^{-4}$  vs. Água e vs. Água+CP; <sup>+</sup>  $p < 0.04$  vs. Etanol (CP- catequinas e procianidinas)..... 125

**Figura 50-** Valor médio do peso corporal dos animais dos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) durante o tratamento (6 meses) e respectivo desvio padrão. \*  $p < 9 \times 10^{-4}$ , \*\*  $p < 2 \times 10^{-3}$  vs. Água; <sup>o</sup>  $p < 0.02$ , <sup>∞</sup>  $p < 0.03$  vs. Água+CP (CP- catequinas e procianidinas). ..... 126

**Figura 51-** Valores médios da ração ingerida/animal/dia por cada grupo durante 6 meses e respectivos desvios padrão (Água+CP:  $p < 0,05$  vs (⊗) semana 6; (⊙) semanas 1,3,6; (©) semanas 3,6; Água:  $p < 0,05$  vs (▼) semana 6; (◀) semana 10; (▲) semanas 6,14; Etanol+CP:  $p < 0,05$  vs (⊛) semanas 1,6; (+) semanas 10;; (⊖) semanas 1,6,16; Etanol:  $p < 0,05$  vs (⊙) semana 6) (CP- catequinas e procianidinas). ..... 128

**Figura 52-** Valores médios da bebida ingerida/animal/dia por cada grupo durante 6 meses e respectivos desvios padrão (Água + CP:  $p < 0,05$  vs (⊗) semana 1; (⊙) semana 8; (©) semanas 6,8; Água:  $p < 0,05$  vs (▲) semanas 3,6,8,16; (◀) semanas 3,8,16; Etanol + CP:  $p < 0,05$  vs (+) semana 1; (⊛) semana 3; Etanol:  $p < 0,05$  vs (⊙) semana 3) (CP- catequinas e procianidinas). ..... 129

**Figura 53-** Valores médios do peso corporal dos animais de cada grupo durante 6 meses e respectivos desvios padrão (Água+CP:  $p < 0,05$  vs (⊗) semana 1; (⊙) semanas 1,3,6; (⊗) semanas 1,3,6,8; (©) semanas 1,3,6,8,10; Água:  $p < 0,05$  vs (◀) semanas 1,3,6; (▼) semanas 1,3,6,8,10; (➤) semanas 1,3,6,8,10,16; Etanol:  $p < 0,05$  vs (■) semanas 1,3; (●) semanas 1,3,6,8) (CP- catequinas e procianidinas)..... 130

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Teor em procianidinas de diferentes produtos alimentares (expresso em unidades equivalentes de catequina; nd- não detectável; vt- vestigial) (Rice-Evans <i>et al.</i> , 1996).....	36
<b>Tabela 2-</b> Gradiente para separação das catequinas e procianidinas oligoméricas por HPLC.....	52
<b>Tabela 3-</b> Composição polifenólica das fracções obtidas por cromatografia em gel Toyopearl TSK.....	55
<b>Tabela 4-</b> Compostos fenólicos isolados da fracção F4 por HPLC-semipreparativa.....	58
<b>Tabela 5-</b> Rendimento do processo de extracção de procianidinas a partir das grainhas de uva (1.3 Kg). .....	59
<b>Tabela 6-</b> Composição polifenólica das fracções identificadas no cromatograma da Figura 24.....	66
<b>Tabela 7-</b> Massa e Rendimento das procianidinas obtidas por síntese.....	68
<b>Tabela 8-</b> Classificação, composição e funções biológicas das diversas lipoproteínas (TAG, triacilglicérido) (Stryer, 1995).....	73
<b>Tabela 9-</b> Reagentes e quantidades utilizados na determinação do conteúdo proteico das LDL pelo método de Lowry. ASB, albumina sérica bovina; reagente A: 150 mL ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 2% em NaOH 0.1 M) + 3 mL ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5% em solução aquosa de citrato de sódio 1%); reagente B: solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteau (50%).....	87
<b>Tabela 10-</b> Actividade antioxidante das catequinas e procianidinas face à oxidação do <i>cis</i> -PnA incorporado nas LDL ( $t_i$ , período de indução; $T_i$ , período de indução molar; $k_{ox}$ , velocidade de oxidação; $K_{ox}$ , velocidade de oxidação molar). .....	94
<b>Tabela 11-</b> Períodos de indução ( $t_i$ ) das catequinas, procianidinas e trolox, ácido ascórbico e ácido cafeico (1.5 $\mu\text{M}$ ) face à oxidação das LDL (30 $\mu\text{g}/2\text{mL}$ ) iniciada pelo AAPH (5 mM). .....	96
<b>Tabela 12-</b> Valores da densidade volumétrica (Vv) e volume de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupados pelos grânulos de lipofuscina nos grupos A (Água), B	

(Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas). ..... 116

**Tabela 13-** Valores da densidade volumétrica ( $V_v$ ) e volume ( $\mu\text{m}^3$ ) de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupados pelo compartimento lisossômico (corpos multivesiculares (CMV) e lisosomas) nos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas)..... 117

**Tabela 14-** Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) da densidade volumétrica ( $V_v$ ) e do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupados pelos grânulos de lipofuscina e pelo compartimento lisossômico (corpos multivesiculares (CMV) e lisosomas) nos animais dos 4 grupos ( $p < 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade). ..... 118

**Tabela 15-** Valores do parâmetro TRAP dos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas). ..... 121

**Tabela 16-** Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) do parâmetro TRAP dos animais dos quatro grupos ( $p > 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade). ..... 122

**Tabela 17-** Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) relativa à variância entre grupos (efeito do tratamento com 3-flavanóis) dos parâmetros ração, bebida e peso dos animais ( $p < 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade). ..... 123

**Tabela 18-** Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) relativa à variância entre semanas (efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis) dos parâmetros ração, bebida e peso dos animais dos quatro grupo ( $p < 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade). ..... 127

**LISTA DE ABREVIATURAS  
E SÍMBOLOS**

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

**A°**: forma oxidada do antioxidante

**AA(O°)**: forma oxidada do ácido ascórbico

**AA(OH)**: forma reduzida do ácido ascórbico

**AAPH**: “2,2’-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride”

**ASB**: albumina sérica bovina

**Abs**: absorvância

**ABTS**: “3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate”

**A<sub>cit</sub>**: área do citoplasma

**AIBN**: “2,2’-azobis (2-methylpropanenitrile)”

**AH**: forma reduzida do antioxidante

**A<sub>lip</sub>**: área dos grânulos de lipofuscina

**AMVN**: “2,2’-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile)”

**(+)-cat**: (+)-catequina

**Cat(O°)**: forma oxidada da (+)-catequina

**Cat(OH)**: forma reduzida da (+)-catequina

**cis-PnA**: ácido *cis*-parinário

**CP**: catequinas e procianidinas

**DAD**: “diode array detector”

**DMPD**: “N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine”

**DNA**: ácido desoxirribonucleico

**DPPH**: “1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl”

**E<sup>0</sup>**: potencial normal de redução

**EDTA**: “ethylenediaminetetraacetic acid”

**(-)-epi**: (-)-epicatequina

**F**: parâmetro característico do teste estatístico

**GABA**: “γ-aminobutyric acid”

**g. l.**: graus de liberdade

**HDL**: “high density lipoprotein”, lipoproteína de alta densidade

**HIV**: “human immunodeficiency virus”, vírus da imunodeficiência humana

**4-HNE**: 4-hidroxinonal

**IDL:** “intermediate density lipoprotein”, lipoproteína de densidade intermédia

**In:** iniciador

**k<sub>ox</sub>:** velocidade de oxidação

**K<sub>ox</sub>:** velocidade de oxidação molar

**LDL:** “low density lipoprotein”, lipoproteína de baixa densidade

**MDA:** malonaldeído

**n:** factor estequiométrico

**nd:** não detectável

**NBS:** N-bromosuccinimida

**p:** nível de significância do teste estatístico

**p.a.:** pró-análise

**PP:** precipitado

**PUFA:** “polyunsaturated fatty acid”, ácido gordo polinsaturado

**R<sub>i</sub>:** velocidade de formação de radicais peroxilo provenientes do AAPH

**RLO:** radicais livres de oxigénio

**RNA:** ácido ribonucleico

**RPE:** ressonância paramagnética electrónica

**rpm:** rotações por minuto

**SDS:** “sodium dodecyl sulfate”

**TAG:** triacilglicérido

**T<sub>amb</sub>:** temperatura ambiente

**TBARS:** “tiobarbituric acid reactive species”, espécies reactivas com o ácido tiobarbitúrico

**t<sub>i</sub>:** período de indução

**T<sub>i</sub>:** período de indução molar

**TRAP:** “total radical-trapping antioxidant parameter”, capacidade antioxidante total

**UA:** unidades de absorvância

**UF:** unidades de fluorescência

**VLDL:** “very low density lipoprotein”, lipoproteína de muito baixa densidade

**vs.:** versus

**vt:** vestigial

**V<sub>v</sub>:** densidade volumétrica

## — OBJECTIVOS —

## Objectivos do Trabalho

Este trabalho teve como principal objectivo conhecer melhor algumas das propriedades biológicas de catequinas e de procianidinas oligoméricas que abundam na dieta mediterrânea. Devido às dificuldades para obter estes compostos no estado puro, a sua biodisponibilidade e mecanismos bioquímicos de actuação no organismo permanecem ainda praticamente desconhecidos.

A primeira parte deste trabalho foi realizada com o objectivo de relacionar a eficiência antioxidante de catequinas e de várias procianidinas oligoméricas com a sua estrutura molecular, isto é, avaliar o efeito de determinadas características estruturais como o grau de polimerização, o tipo de unidade monomérica constituinte ((+)-catequina e (-)-epicatequina), o tipo de ligação interflavonóide (C4-C6 e C4-C8) e a esterificação com o ácido gálico, na sua acção antioxidante. Este estudo foi realizado *in vitro* utilizando como modelo biológico as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humanas, transportadoras do colesterol plasmático, por forma a avaliar a potencial acção preventiva destes polifenóis face ao desenvolvimento de arteriosclerose e doenças cardiovasculares inerentes, que constituem uma das principais causas de mortalidade

Procedeu-se também ao estudo *in vivo* do efeito de um extracto de grainhas constituído essencialmente por catequinas e procianidinas oligoméricas a nível cerebral na prevenção do envelhecimento biológico em condições normais e mediante alterações morfológicas no cérebro induzidas pelo etanol.

## — INTRODUÇÃO GERAL —

## Introdução Geral

Nas últimas décadas o Homem tem manifestado um crescente interesse pelo seu bem-estar e qualidade de vida, o que tem motivado a comunidade científica a procurar e identificar substâncias, naturais ou sintéticas, potencialmente benéficas para o organismo, nomeadamente com princípios activos face à prevenção de doenças e do envelhecimento.

As doenças cardiovasculares e o cancro constituem uma das maiores preocupações da Humanidade dada a sua elevada incidência e fatalidade. Está comprovado cientificamente que uma dieta rica em frutos e legumes previne a ocorrência destas patologias, sendo este efeito protector atribuído em parte, a compostos que apresentam propriedades antioxidantes tais como a vitamina C, a vitamina E, os carotenóides ( $\beta$ -caroteno e outros) e a compostos polifenólicos. O sucesso da dieta mediterrânea na prevenção destas doenças degenerativas deve-se ao consumo reduzido de carnes vermelhas e elevado uso de azeite, de frutos, de legumes e uma ingestão moderada de vinho tinto. O denominador comum deste regime está no consumo de produtos que contêm um elevado teor em compostos polifenólicos que podem actuar como antioxidantes.

### 1- Os Compostos Polifenólicos

Os compostos polifenólicos resultam do metabolismo secundário das plantas e integram as paredes celulares onde participam na formação de moléculas de lenhina altamente polimerizadas (Amrani *et al.*, 1994).

Estes compostos desempenham um importante papel na natureza actuando a nível fisiológico na coloração e regulação da maturação dos frutos (Golstein *et al.*, 1963) e na protecção destes face a agentes agressores tais como as bactérias e os insectos (Strong *et al.*, 1979). A nível nutricional exercem uma acção preponderante no desenvolvimento de características sensoriais como a cor e o sabor de certos alimentos (Haslam, 1980). No plano médico, parecem contribuir para a defesa antioxidante do organismo e prevenir a ocorrência de doenças cardiovasculares (Frankel *et al.*, 1993, 1995; Teissedre *et al.*, 1995; Carbonneau *et al.*, 1997; Laranjinha e Cadenas, 1999; Ivanov *et al.*, 2001) e certos tipos de cancro (Gali *et al.*, 1994; Sakagami *et al.*, 1995; Kolotziej *et al.*, 1995).

Na natureza existe uma elevada variedade de compostos polifenólicos que apresentam uma grande diversidade estrutural. Um dos grupos de compostos polifenólicos mais

importante é a dos flavonóides que apresentam como estrutura básica o núcleo flavânico (Figura 1).

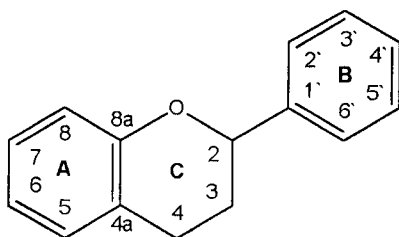


Figura 1- Estrutura e sistema de numeração do núcleo flavânico.

A estrutura dos diferentes flavonóides difere no grau e posição de grupos cetona e hidroxilo, e na natureza e extensão de alquilação e glicosilação dos grupos hidroxilo. Os flavonóides apresentam como local preferencial de glicosilação o grupo hidroxilo do carbono C3, podendo esta substituição também ocorrer nas posições C5 e C7.

Estima-se que existam cerca de 5000 tipos de flavonóides estruturalmente diferentes (Chung *et al.*, 1998; Santos Buelga *et al.*, 2000). Como principais famílias de flavonóides na natureza citam-se as antocianidinas, os flavanóis, os flavonóis, as flavonas e as flavanonas (Figura 2).

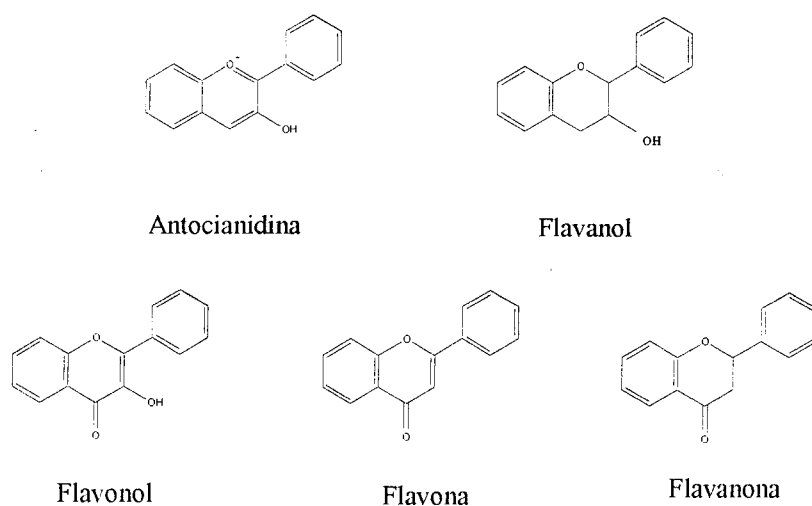


Figura 2- Classificação dos principais famílias de flavonóides na natureza.

Da família dos flavonóis refira-se a quercetina que se encontra presente no chá e vinho tinto e à qual vários estudos têm atribuído uma relevante actividade antioxidante a nível biológico nos últimos anos (Sichel *et al.*, 1991; Kitagawa *et al.*, 1992).

Para além dos flavonóides, existem outras famílias de compostos polifenólicos importantes na natureza tais como os ácidos fenólicos e os estilbenos. Os ácidos fenólicos como o cafeico, o cumárico e o ferrúlico abundam nos frutos e apresentam também uma actividade antioxidante significativa (Laranjinha e Cadenas, 1999). A família dos estilbenos, da qual faz parte o resveratrol, tem revelado uma importante acção inibitória face à oxidação lipídica (Frankel *et al.*, 1993).

### 1.1- As Catequinas

As catequinas pertencem à família dos 3-flavanóis e são constituídas por um anel floroglucinol (A), um anel pirânico (C) e um anel catecol (B) (Figura 3).

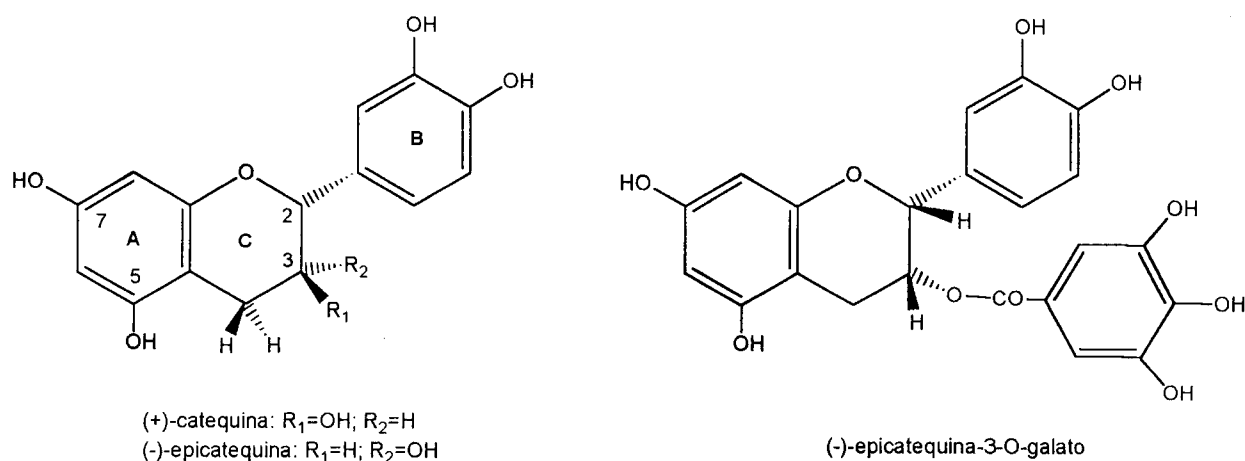


Figura 3- Estrutura das catequinas abundantes na natureza.

Os carbonos C2 e C3 desta unidade são assimétricos constituindo centros quirais, dos quais resultam 4 isómeros: (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Nos isómeros (+)-catequina e (+)-epicatequina o grupo 3,4-diidrofenilo ligado ao carbono C2 e o grupo hidroxilo carbono C3 surgem em posição *trans* (2*R*, 3*S*) e nos restantes isómeros em posição *cis* (2*R*, 3*R*). Na natureza os isómeros mais abundantes são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina.

Estes compostos podem encontrar-se esterificados com um grupo galoílo na posição C3 (ésteres do ácido gálico) (Figura 3).

## 1.2- As Procianidinas

As procianidinas também pertencem ao grupo dos 3-flavanóis e são polímeros constituídos por duas ou mais unidades monoméricas de catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina).

As estruturas diméricas destes compostos são do **tipo B** ( $C_{30}H_{26}O_{12}$ ), se a ligação entre as unidades monoméricas (ligação interflavonóide) é estabelecida entre o carbono C4 da unidade superior e o carbono C8 ou C6 da unidade inferior (C4-C6 ou C4-C8) (Figura 4), ou do **tipo A** ( $C_{30}H_{24}O_{12}$ ) se, para além da ligação entre átomos de carbono, apresentam uma ligação éter C2-O-C7 adicional entre as duas unidades monoméricas (Figura 5).

As procianidinas podem também apresentar na sua estrutura um ou mais grupos galoílo (ésteres galato) (Figura 6).

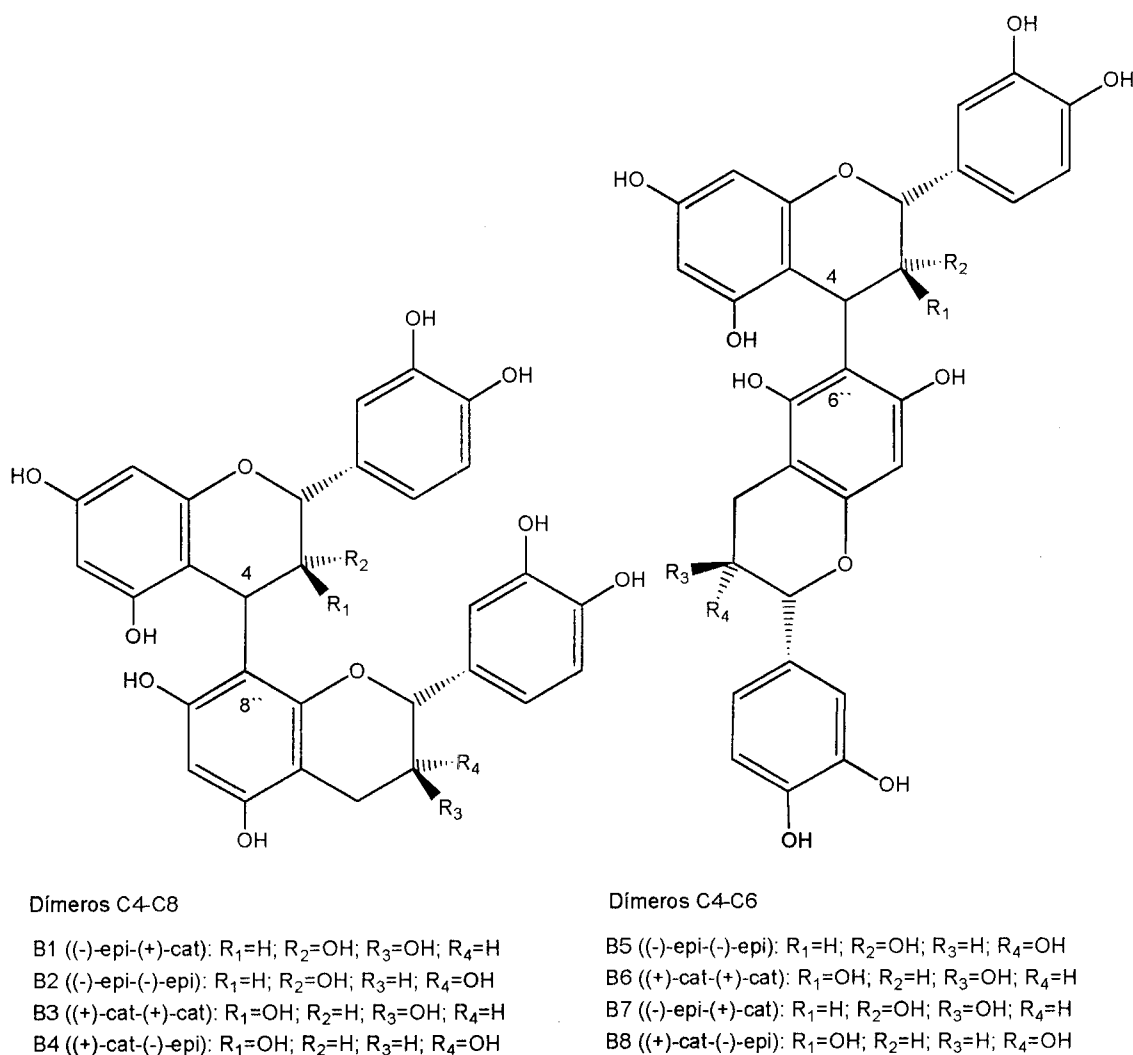
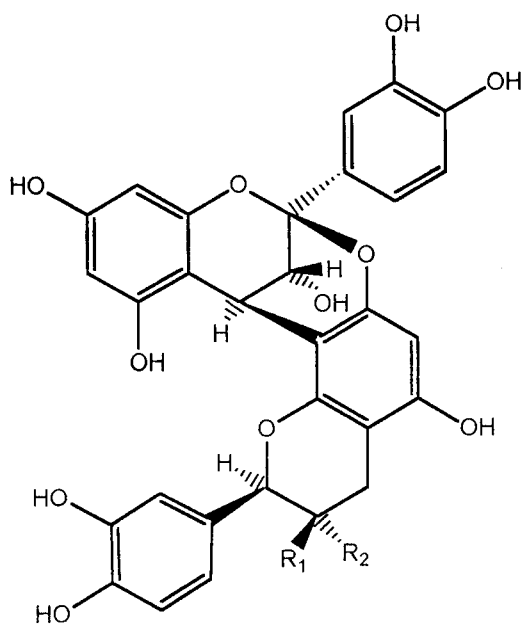


Figura 4- Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.



A<sub>1</sub>: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H  
 A<sub>2</sub>: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OH

Figura 5- Estrutura de procianidinas diméricas do tipo A.

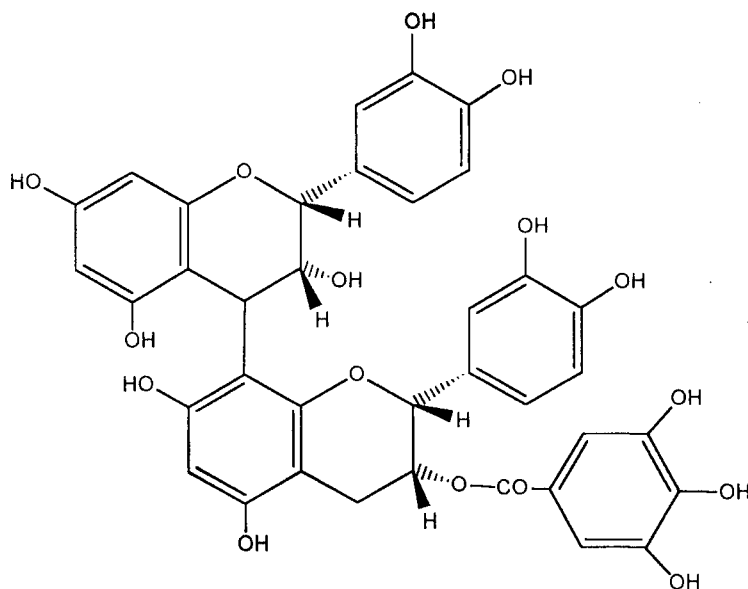
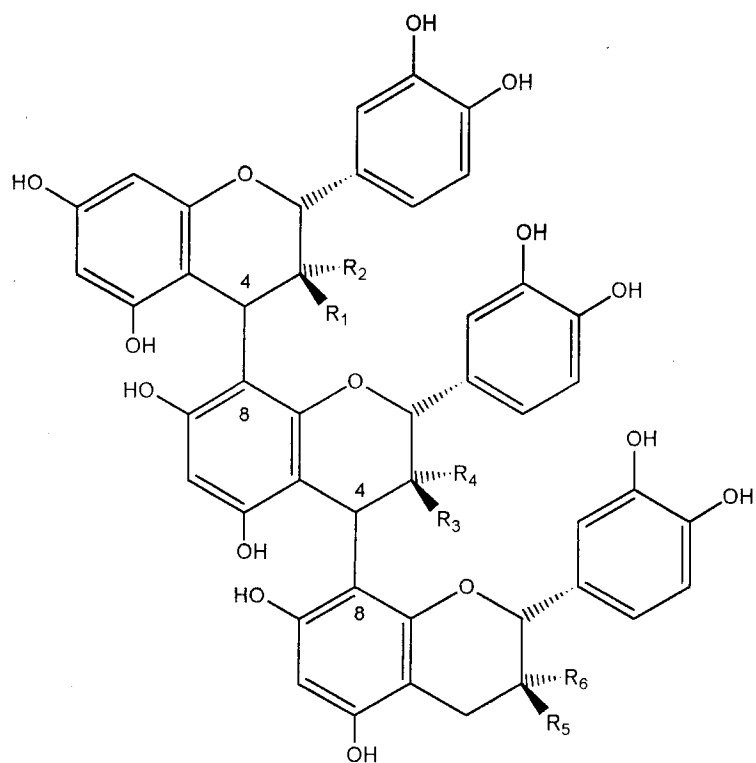


Figura 6- Estrutura de uma procianidina esterificada com o ácido gálico (B2-3''-O-galato).

As *procianidinas triméricas* podem ser do **tipo C**, se as ligações interflavonóides são do tipo B, ou do **tipo D**, se uma ligação é do tipo B e outra é do tipo A (Figura 7).



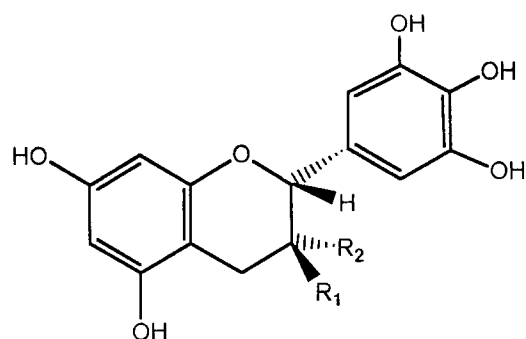
C1 ((-)-epi-(-)-epi-(-)-epi) :  $R_1, R_3, R_5 = H$ ;  $R_2, R_4, R_6 = OH$   
 T1 ((-)-epi-(-)-epi-(+)-cat) :  $R_1, R_3, R_6 = H$ ;  $R_2, R_4, R_5 = OH$

Figura 7- Estrutura de procianidinas triméricas do tipo C.

As formas mais condensadas das procianidinas podem-se dividir em procianidinas oligoméricas cujo número de unidades monoméricas é igual ou inferior a 6, e procianidinas poliméricas com um número de unidades monoméricas superior.

### 1.3- As Prodelfinidinas

As prodelfinidinas constituem uma família de polímeros hidrossolúveis semelhante à das procianidinas que diferem apenas na unidade monomérica, que consiste numa molécula de galocatequina (Figura 8).



(+)-galocatequina:  $R_1=OH$ ;  $R_2=H$   
 (-)-epigalocatequina:  $R_1=H$ ;  $R_2=OH$

Figura 8- Estrutura de prodelfinidina.

As procianidinas e as prodelfinidinas pertencem à família das proantocianidinas, também designadas por taninos condensados <sup>(1)</sup>. A origem do nome *proantocianidina* resulta do facto destes compostos quando aquecidos em condições ácidas libertarem unidades de antocianidina (pigmentos vermelhos), segundo a reacção de Bate-Smith.

#### 1.4- Os Taninos hidrolisáveis

Em determinadas espécies vegetais existem também os taninos hidrolisáveis ou gálicos que são constituídos por um núcleo central de glucose na qual os grupos hidroxilo estão esterificados, total ou parcialmente, com moléculas de ácido gálico (Figura 9).

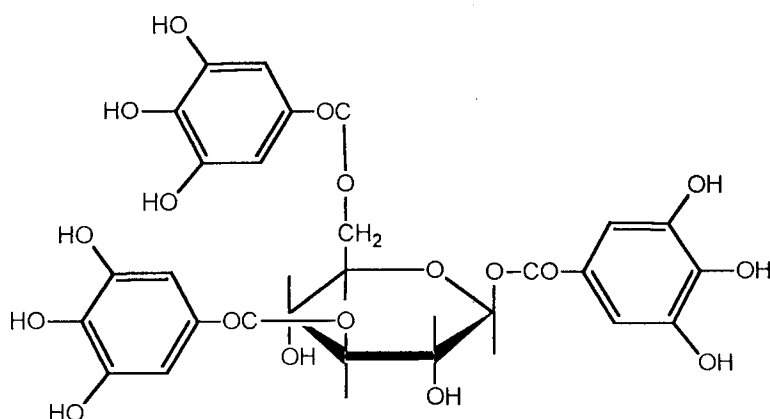


Figura 9- Estrutura de um tanino hidrolisável.

<sup>(1)</sup> A designação tanino provém da capacidade destes compostos transformarem pele fresca em couro ("tanning" que significa curtimento).

## 2- Ocorrência dos 3-flavanóis na natureza e sua biodisponibilidade

As catequinas e as procianidinas (3-flavanóis) estão presentes em grande concentração em alimentos vegetais que fazem parte da dieta mediterrânea como cereais, legumes e frutas, bem como no vinho, no chá, na cidra e noutras bebidas (Tabela 1).

Tabela 1- Teor em procianidinas de diferentes produtos alimentares (expresso em unidades equivalentes de catequina; nd- não detectável; vt- vestigial) (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Produto	Teor
<b>Cereais (mg/100g)</b>	
lentilha	316-1040 (peso seco)
fava	nd-740
cevada	64-126
<b>Frutas (mg/100g)</b>	
maçã	17-50 (peso seco)
pêra	0,7-12
uva	1-160
cereja	10-23
morango	2-50
<b>Sumos e Bebidas (mg/L)</b>	
sumo de maçã	nd-298
puré de maçã	16-43
puré de pêssego	9,5-24
sumo de pêra	11-74
cidra	2290-3710
vinho tinto	nd-500
vinho branco	vt-7
vinho rosé	vt-43
cerveja	3,5-19,5
<b>Outros (mg/100g)</b>	
cacau	260-1200

Estima-se que o consumo humano diário de procianidinas varie entre 20-1000 mg/dia (Hertog *et al.*, 1993; Scalbert *et al.*, 2000), predominando a forma dimérica (Rohrbach *et al.*, 1990). O vinho constitui uma das principais fontes de obtenção destes polifenóis na dieta mediterrânea (Gaulejac *et al.*, 1999).

Apesar das procianidinas abundarem na alimentação, a sua disponibilidade no organismo permanece ainda pouco esclarecida atendendo às dificuldades inerentes ao processo de análise deste compostos (Santos Buelga *et al.*, 2000).

Estudos envolvendo a administração de procianidinas marcadas radiactivamente a ratos demonstraram que 54% da actividade radiactiva se concentra na urina e desta constam

produtos de baixo peso molecular como o ácido hipúrico, o etilcatecol e os ácidos fenólicos (Harmand *et al.*, 1978). Outros estudos realizados igualmente com procianidinas marcadas revelaram que 1 h após a sua ingestão via oral se verifica um máximo de radioactividade na corrente sanguínea, e que nas 6 h seguintes ocorre uma distribuição destas espécies por todo o organismo, com zonas preferenciais de localização como a aorta, o duodeno e o fígado. Não se conhece no entanto a forma e a natureza destas espécies radiactivas (Dédrez, 1999).

Pensa-se que os compostos polifenólicos de mais baixo peso molecular, como as catequinas, são capazes de atravessar directamente a barreira intestinal, mas as formas mais condensadas poderão sofrer uma metabolização prévia pela microflora intestinal segundo processos de desidroxilação, metilação ou ligação a grupos sulfato (Jimenez-Ramsey *et al.*, 1994). Depreende-se então que apenas uma reduzida porção de procianidinas ingeridas mantém intacta a sua estrutura nativa, limitando desta forma a sua potencial acção no organismo.

### **3- Propriedades fisico-químicas dos polifenóis e seus efeitos biológicos**

A natureza polifenólica e o elevado peso molecular são características estruturais que conferem a determinados polifenóis, nomeadamente aos 3-flavanóis (catequinas e procianidinas), propriedades fisico-químicas como: capacidade de formação de complexos insolúveis com proteínas, complexação de certos iões metálicos, elevado poder redutor e capacidade de neutralizar radicais livres de oxigénio (RLO). Estas propriedades são responsáveis por muitos dos efeitos biológicos que lhes são atribuídas na literatura tais como a sua acção antitumoral, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, vasoprotectora, inibidora de enzimas (fosfolipase A2, cicloxigenase, lipoxigenase glutathione reductase, xantina oxidase), anti-alérgica e ainda uma actividade antioxidante com especial relevo. Para além duma acção preventiva, as procianidinas podem também apresentar efeitos terapêuticos em casos de anemia, isquémia, diarreia, etc.

#### **3.1- Interação dos polifenóis com proteínas**

Como agentes complexantes os polifenóis, e nomeadamente os 3-flavanóis (catequinas e procianidinas) são capazes de interactuar com diversas proteínas formando complexos insolúveis (Haslam, 1980). Tratam-se de interacções dinâmicas de superfície, nomeadamente ligações por pontes de hidrogénio e ligações hidrofóbicas, que se estabelecem entre os grupos fenólicos, dadores de prótons, das procianidinas e os grupos carbonilo, receptores de prótons, dos péptidos (Hagerman *et al.*, 1980).

A intensidade destes fenómenos depende da natureza da proteína e da procianidina em questão. As proteínas com elevado teor em prolina, como o colagénio, gelatina, proteínas salivares e caseína, revelam uma maior afinidade para com as procianidinas (Hagerman *et al.*, 1980). A glicosilação das proteínas pode igualmente afectar esta interacção. As procianidinas de maior peso molecular (Sarni-Manchado *et al.*, 1999) e as que apresentam o ácido gálico como substituinte apresentam maior afinidade com as proteínas (Ricardo da Silva *et al.*, 1991; De Freitas e Mateus, 2001, 2002). Goldstein e Swain, em 1963, sugeriram que as procianidinas de baixo peso molecular são demasiado pequenas para estabelecer pontes interpeptídicas e que as procianidinas muito condensadas são demasiado volumosas para poderem interactuar eficientemente na matriz da proteína.

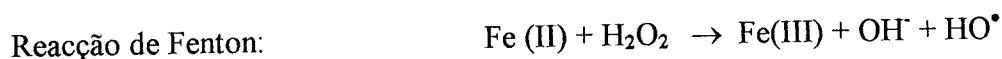
A interacção dos polifenóis com as proteínas salivares está na origem da sensação de adstringência característica dos alimentos que contêm elevado teor destes compostos. Esta capacidade de complexação exibida pelas procianidinas pode ter variados efeitos no organismo dependendo do alvo de interacção (enzimas, toxinas, hormonas, etc.). Por exemplo, a interacção ao nível do intestino com enzimas digestivas ou directamente com proteínas provenientes da dieta limita a absorção destas últimas. No entanto, uma dieta rica em taninos desencadeia no organismo processos adaptativos que contrariam este efeito antinutricional como sendo uma estimulação da secreção de proteínas salivares endógenas que se ligam às procianidinas e permitem a absorção das proteínas de maior valor alimentar (Butler *et al.*, 1992) e um aumento do nível de determinadas proteases, lipases (Lizardo *et al.*, 1995) e também de sais biliares (Horigome *et al.*, 1988).

As procianidinas podem ainda interactuar com as moléculas de colagénio das paredes dos vasos sanguíneos estabelecendo ligações do tipo “cross-links” entre as cadeias peptídicas e deste modo aumentar a resistência capilar (Masquelier, 1988). Esta foi a primeira propriedade atribuída aos compostos polifenólicos. Em 1963, Szent-György extraiu os primeiros compostos fenólicos do limão misturados com a vitamina C e esta mistura, designada por citrina, apresentava propriedades vasoprotectoras e reforçava a resistência capilar, pelo que foi designado por vitamina P (“Permeabilidade” vascular). Esta capacidade das procianidinas em complexar proteínas pode ainda ser usada com fins terapêuticos em casos de: i) diarreia pela complexação da toxina da cólera e de proteínas da mucosa intestinal com consequente formação de uma camada protectora (Galvez *et al.*, 1991); ii) cáries dentárias pela inibição da actividade de transferases que catalisam a acumulação de complexos insolúveis nos dentes (Hattori *et al.*, 1990) e pela inibição do crescimento do *Streptococcus cariogénico* (Sakanaka *et al.*, 1989).

### 3.2- Complexação entre polifenóis e iões metálicos

A estrutura 3',4'-dihidroxifenol do anel B (catecol) das catequinas e procianidinas permite a complexação de determinados iões de metais de transição (Kennedy *et al.*, 1985; Carbonneau *et al.*, 1997; Marmolle *et al.*, 1997). Uma dessas espécies é o Fe(III) proveniente da alimentação, cuja interacção com as procianidinas vai limitar a sua absorção e consequentemente a sua disponibilidade no organismo. Este fenómeno pode ter repercussões graves em pessoas com deficiência de ferro no organismo e sobretudo nas crianças e mulheres grávidas.

Mas, a complexação do Fe(III) apresenta benefícios na medida em que, quando complexado este não é capaz de sofrer redução a Fe(II), que actua como catalisador da reacção de Fenton da qual resultam radicais livres altamente nocivos para o organismo (HO<sup>•</sup>).



Deste modo as procianidinas parecem ser capazes de prevenir a formação de alguns radicais livres oxigenados e a ocorrência de consequentes lesões no organismo.

As procianidinas são ainda capazes de complexar o ião Al(III) limitando a sua absorção a nível intestinal e desta forma reduzir o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer, associada normalmente a uma elevada concentração deste ião (Orgogozo *et al.*, 1997).

Por outro lado, verificou-se que o consumo de chá, rico em polifenóis, aumentava a absorção de cobre embora se desconheça qual o componente da bebida responsável por tal incremento (Vaquero *et al.*, 1994). O zinco por seu lado possui uma baixa afinidade para com as procianidinas (Flanagan *et al.*, 1985).

### 3.3- Neutralização de radicais livres de oxigénio pelos polifenóis

Os polifenóis, e nomeadamente os 3-flavanóis, são capazes de neutralizar *in vitro* radicais livres de azoto e de oxigénio (RLO) pela cedência de átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo, originando radicais fenoxilo (semiquinona) relativamente estáveis (Bors e Saran, 1987; Ariga e Hamano, 1990; Hirose *et al.*, 1990; Ricardo da Silva *et al.*, 1991 (b); Sichel *et al.*, 1991; Kitagawa *et al.*, 1992; Plumb *et al.*, 1998; Gaulejac *et al.*, 1999 (a), (b)), e poderão desta forma impedir o efeito degenerativo destas espécies no organismo.

Estima-se que 2-5% do oxigénio utilizado na respiração origina radicais livres de oxigénio. Estas espécies, pelo facto de possuírem um electrão desemparelhado na sua estrutura electrónica, apresentam uma potente acção oxidante. Esta propriedade é útil na depuração de resíduos do organismo e defesa imunitária, mas a sua actuação indiscriminada é responsável pela oxidação de biomoléculas importantes no normal funcionamento do organismo humano. Os radicais livres são regularmente produzidos nas células metabolicamente activas (cadeia respiratória, reacções enzimáticas, ...) e resultam da activação do oxigénio molecular (redução univalente) por captação de um electrão (Figura 10).

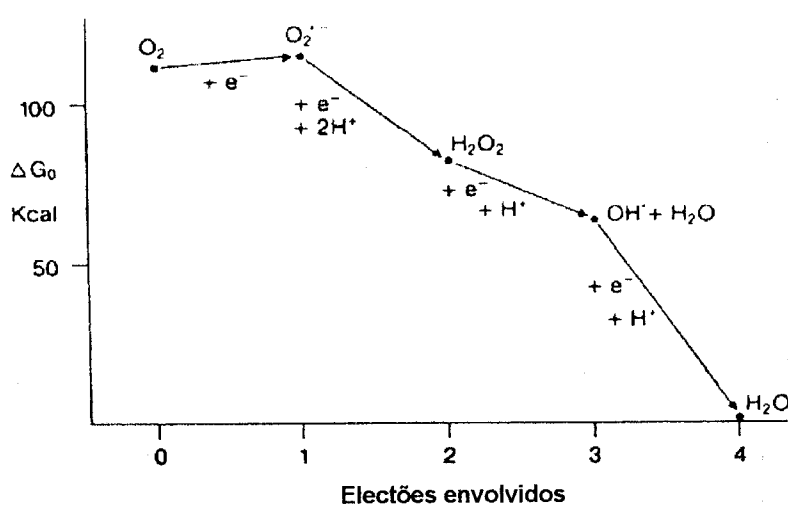


Figura 10- Energética da redução do oxigénio a 25°C e pH 7.0.

O radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) resulta da exposição do oxigénio a radiação ionizante mas também é produzido pelo organismo (mitocôndria, ...) e tem uma reactividade modesta, tal como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), comparativamente ao radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ). O peróxido de hidrogénio pelo facto de não apresentar carga é capaz de atravessar facilmente as biomembranas e no interior das células pode sofrer dismutação (reacção de Fenton) originando o radical hidroxilo que reage indiscriminadamente com várias moléculas. Apenas a activação do oxigénio molecular requer energia, pelo que a formação dos radicais livres derivados, e mais perigosos, ocorre espontaneamente na presença de dadores de electrões e de prótons.

De um modo geral estas espécies (RLO) provocam a oxidação de várias biomoléculas como os lípidos, da qual resultam profundas alterações das membranas biológicas, as

proteínas, provocando a modificação estrutural e funcional de enzimas e receptores celulares, e ainda a oxidação de DNA, que contribui para a ocorrência de mutagénese e carcinogénese.

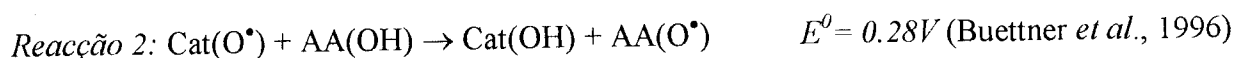
A produção excessiva de RLO provoca uma situação de stress oxidativo no organismo, a qual por sua vez resulta num aumento dos níveis de RLO e consequentemente numa ruptura do equilíbrio oxidação-redução promovendo a peroxidação lipídica e degradação de compostos metabolicamente activos, que se poderão traduzir no desenvolvimento de variadas patologias e envelhecimento precoce (Keher *et al.*, 1994).

A química dos polifenóis é predictiva da sua capacidade neutralizadora de radicais livres oxigenados já que a sua forma radicalar (semiquinona) apresenta em geral um potencial normal de redução ( $E^0$ ) inferior ao dos radicais alquilo, peróxido e do radical superóxido, o que significa que são capazes de inactivar estes radicais e prevenir a sua actuação degenerativa (Wardman, 1989; Jovanovic *et al.*, 1992).

As catequinas e as procianidinas neutralizam os radicais livres oxigenados ( $R^*$ ) cedendo átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo localizados preferencialmente no anel B, devido à acessibilidade estereoquímica destes e à posição *orto* dos dois grupos hidroxilo que favorece a deslocalização electrónica do electrão e confere uma grande estabilidade à forma radicalar (Ariga *et al.*, 1990; Sichel *et al.*, 1991; Kitagawa *et al.*, 1992). A substituição no anel A da estrutura polifenólica parece exercer uma influência pouco significativa no potencial de redução da semiquinona formada (Jovanovic *et al.*, 1998).



Por sua vez, o radical fenoxilo derivado da catequina ( $\text{Cat(O}^*)$ ) pode reagir com um outro agente antioxidante cuja forma radical possua um potencial de redução inferior, como é o caso do ácido ascórbico ( $\text{AA(OH)}$ ), regenerando-se a procianidina com formação simultânea de um outro radical (radical ascorbato) ( $\text{AA(O}^*)$ ) ainda menos reactivo (Reacção 2).



Esta sequência de reacções pode ocorrer no organismo no sentido da formação de espécies radicalares progressivamente menos activas e, consequentemente menos agressivas (Laranjinha e Cadenas, 1999).

Os polifenóis, em actuação conjunta com as defesas antioxidantes endógenas e mecanismos fisiológicos específicos do organismo, contribuem para o controlo da formação e actuação danosa destes intermediários altamente reactivos.

#### **4- Acção antioxidante dos polifenóis**

A acção antioxidante das catequinas e procianidinas ainda não se encontra totalmente descrita e compreendida em termos mecanísticos, mas analogamente a outros compostos fenólicos, pensa-se estarem envolvidos vários processos já descritos anteriormente: **complexação de iões de metais de transição, neutralização de radicais livres** (“free radical scavenging”) e **regeneração da vitamina E** (Kuhnau, 1976; Frankel *et al.*, 1993; Jovanovic *et al.*, 1994; Cadenas, 1998; Plumb *et al.*, 1998).

Qualquer antioxidante para usufruir de tal estatuto deve obedecer a certos requisitos: por um lado deve ser capaz de inibir a oxidação mesmo em baixas concentrações (Halliwell, 1990) e a sua forma oxidada deve ser suficientemente estável para não desencadear novas reacções de oxidação (Shahidi *et al.*, 1992). Os 3-flavanóis cumprem estas exigências já que estudos realizados comprovaram a sua eficiência antioxidante mesmo em pequenas quantidades e características estruturais como a presença da unidade catecol em conjugação com a sua aromaticidade proporcionam uma elevada estabilidade à forma oxidada do polifenol (Bors e Saran, 1987; Bors *et al.*, 1990; Ariga e Hamano, 1990; Kitagawa *et al.*, 1992).

As mesmas propriedades que determinam a actividade antioxidante de um composto são responsáveis pela manifestação de potenciais efeitos prooxidantes. Estes compostos ao neutralizarem radicais livres transformam-se eles próprios num radical, cuja reactividade depende do carácter redox e condições envolventes como concentração, temperatura, presença de activadores, entre outras. Nas condições fisiológicas, as procianidinas surgem em baixa concentração e as suas propriedades químicas conferem-lhes uma estabilidade suficiente para não desencadear novos processos oxidativos.

#### **5- Os Polifenóis e a prevenção de doenças cardiovasculares**

Em 1933, F. Drougnac realizou estudos nos quais concluiu que a percentagem de população idosa numa região francesa com tradições vinícolas era superior à da restante população de França, sugerindo uma ligação entre o consumo regular de vinho (2 copos/dia) e uma menor taxa de mortalidade.

Em 1979 foi publicado um trabalho (St. Leger *et al.*, 1979) no qual se correlacionava o habitual consumo de vinho com uma baixa taxa de mortalidade devida a problemas cardiovasculares em populações que apresentavam um elevado teor de colesterol plasmático e hábitos fumadores (elevados factores de risco).

Esta aparente contradição, que esteve na origem do *Paradoxo Francês* <sup>(2)</sup>, sugeria que algum componente do vinho teria um efeito protector face ao desenvolvimento de arteriosclerose, principal causa de doenças cardiovasculares.

Inúmeros estudos foram realizados desde então e concluiu-se que os compostos polifenólicos, presentes em grande concentração no vinho, especialmente no tinto, estão associados à diminuição de vários factores de risco de doenças cardiovasculares, como uma descida da pressão arterial e uma diminuição do nível de colesterol plasmático (Green *et al.*, 1986; Stensvold *et al.*, 1992; Tebib *et al.*, 1994).

Em face dos resultados obtidos *in vitro*, os polifenóis, e nomeadamente os 3-flavanóis, parecem ser capazes de actuar via três mecanismos na prevenção das doenças cardiovasculares: i) **inibição da oxidação das LDL** (lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade transportadoras do colesterol), através da quelatação de iões metálicos, neutralização de radicais livres e regeneração da vitamina E (Terao *et al.*, 1994; Frei, 1995); ii) **inibição da agregação de plaquetas** (Fuster e Lewis., 1994), a agregação excessiva de plaquetas resultante da peroxidação lipídica torna-se perigosa porque pode criar um obstáculo ao fluxo sanguíneo; iii) **protecção do aparelho vascular** por interacção com cadeias peptídicas de colagénio e elastina que revestem os vasos sanguíneos.

Estudos mostraram que o consumo de vinho tinto (Maxwell *et al.*, 1994), de vinho tinto desalcoholizado (Serafini *et al.*, 1998), de chá (Serafini *et al.*, 1996) e a administração de polifenóis extraídos do vinho tinto (Carbonneau *et al.*, 1997) a voluntários provoca um aumento da capacidade antioxidante do plasma. Este fenómeno não se verificou porém na ingestão de vinho branco (Serafini *et al.*, 1998) ou vodka (Kondo *et al.*, 1994), bebidas relativamente pobres em polifenóis. Verificou-se também que o vinho e as uvas possuem uma capacidade antioxidante mais potente que os polifenóis puros sugerindo uma acção sinérgica entre os compostos (Gaulejac *et al.*, 1999 (a)).

Nos ratos verificou-se que o vinho tinto reduziu o risco de trombose, enquanto o vinho branco e o álcool etílico não revelaram qualquer efeito (Wollny *et al.*, 1999). Nos humanos nenhum ensaio revelou qualquer efeito (Pace-Asciak *et al.*, 1996), desconhecendo-se ainda as razões de tal facto.

<sup>(2)</sup> Campanha mediática que serviu para aumentar o consumo de vinho na década de 80, numa altura em que este diminuía acentuadamente face aos inúmeros movimentos das ligas de combate ao alcoolismo.

Mas nem todos os estudos referidos na literatura suportam a teoria que o consumo de bebidas ricas em polifenóis podem trazer benefícios biológicos. De facto, De Rijke e colaboradores (1996) mostraram que estudos envolvendo o isolamento das LDL após um tratamento de 4 semanas com consumo diário de 5 copos de vinho demonstraram que a oxidabilidade das lipoproteínas não era afectada. Uma possível explicação talvez resida numa absorção insuficiente de compostos polifenólicos ou numa alteração estrutural destes compostos aquando da metabolização da qual podem resultar metabolitos altamente polares incapazes de serem incorporados nas LDL e que se mostram tão eficientes como o ácido ascórbico (Jialal *et al.*, 1990). Outros autores notificaram que a ingestão de chá e vinho não tinha qualquer efeito no nível de antioxidantes (Serafini *et al.*, 1998) ou de lípidos oxidados (Van Het Hof *et al.*, 1997) no plasma. Este facto pode ser devido à curta duração do tratamento, já que esta estratégia quando aplicada durante 19 meses a ratos teve resultados positivos (Yoshino *et al.*, 1994).

Embora esteja comprovado que os polifenóis previnem a oxidação *in vitro* das LDL estes resultados não podem ser extrapolados para a situação *in vivo* já que a maioria dos compostos ingeridos não atinge os tecidos e a sua forma activa natural pode não ser preservada.

Como conclusão pode-se referir que ainda subsistem muitas dúvidas e contrariedades nesta matéria, mas a maioria dos trabalhos sugere uma acção protectora dos compostos polifenólicos do vinho e do chá face à oxidação lipídica. No entanto são necessários mais estudos relativos à biodisponibilidade destes compostos bem como à sua metabolização no organismo.

## **6- Os Polifenóis e a prevenção do cancro**

Os polifenóis e em particular as procianidinas parecem igualmente exhibir uma acção protectora face ao desenvolvimento de tumores e mutações (Gali *et al.*, 1994; Kolotziej *et al.*, 1995; Sakagami *et al.*, 1995).

Este efeito protector pode dever-se a três possíveis mecanismos de actuação: neutralização de radicais livres de oxigénio, interacção com proteínas e a complexação de iões de metais de transição. A capacidade neutralizadora de radicais livres pelos polifenóis já foi extensamente

descrita anteriormente. Os compostos fenólicos podem interactuar com variadas moléculas como: i) dupla hélice de DNA impedindo a actuação de agentes agressores e a clivagem destas moléculas (Cozzi *et al.*, 1995); ii) proteínas do epitélio do tracto digestivo superior formando uma camada protectora sem necessidade de absorção; iii) enzimas envolvidas no processo tumoral, inactivando-as (Gali *et al.*, 1994). Os polifenóis parecem também intervir ao nível da prevenção do cancro de órgãos internos, nomeadamente do pulmão (Prescott *et al.*, 1999). Os compostos fenólicos parecem ainda ser capazes de complexar iões de alguns metais impedindo não só a sua acção catalítica em reacções de oxidação, como a sua actuação como cofactores de enzimas intervenientes no desenvolvimento de tumores (Gali *et al.*, 1994).

Um estudo realizado *in vivo* com procianidinas revelou que estas são capazes de inibir um potente indutor de tumores da epiderme de ratos (Gali *et al.*, 1994). Um outro estudo com ratos demonstrou que os derivados galato das procianidinas apresentam uma actividade antitumoral ainda mais significativa (Kashiwada *et al.*, 1992). A ingestão de extractos de chá preto e verde por ratos demonstrou igualmente um efeito quimiopreventivo face à indução de tumores por agentes cancerígenos (Katiyar *et al.*, 1996), pensando-se que a (-)-epigallocatequina-3'-O-galato desempenhe um papel preventivo relevante (Cao *et al.*, 1996).

O vinho exhibe dois efeitos antagónicos. Por um lado os seus constituintes fenólicos actuam como agentes protectores, mas o seu conteúdo alcoólico é responsável por um efeito procarcinogénico particularmente no tracto digestivo superior (Kato *et al.*, 1992), daí a importância do seu consumo moderado. Um estudo demonstrou que o consumo de bebidas ditas espirituosas e de cerveja aumentava o risco de cancro na faringe e no esófago, enquanto que esse risco era diminuído quando a proporção de vinho ingerido aumentava (Gronbaek *et al.*, 1998). Este facto pode ser explicado pelo elevado teor de nitrosaminas na cerveja e baixo no vinho (Berger, 1998) e talvez também pela presença mais significativa no vinho de agentes protectores como por exemplo as procianidinas, que podem atenuar o efeito nocivo do etanol (Clifford *et al.*, 1996).

## 7- Os Polifenóis como agentes antimicrobianos

Os polifenóis são capazes de afectar a viabilidade de variados fungos (Rudman, 1962; Haars *et al.*, 1981), leveduras (Jacob e Pignal, 1972), vírus como o Influenza (Carson e Frisch, 1953), Herpes simplex (Takechi *et al.*, 1985), vírus do mosaico do tabaco (Thresh, 1956), HIV (Chang *et al.*, 1994) e inúmeras bactérias (Waage *et al.*, 1984; Sakanaka *et al.*, 1989).

— PARTE 1 —

**OBTENÇÃO DE 3-FLAVANÓIS**

## Parte 1- Obtenção de 3-flavanóis

Na primeira parte deste trabalho obtiveram-se os seguintes compostos polifenólicos no estado puro: os monómeros (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-3-O-galato, os dímeros B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 e B2-3''-O-galato e ainda os trimeros C1 e T1, para se proceder na Parte 2 ao estudo da sua actividade antioxidante face à oxidação das lipoproteínas (LDL) humanas.

Estes compostos fenólicos, com excepção das catequinas, não existem no comércio, pelo que foram obtidos por síntese ou extraídos das grainhas de uvas. O rendimento do processo de extracção é muitas vezes demasiado baixo e o processo de purificação de certas procianidinas é difícil dado o elevado número de compostos estruturalmente muito semelhantes (isómeros presentes nos extractos de grainhas). Nestes casos a síntese química, recorrendo a métodos específicos, constitui um processo alternativo para a obtenção de procianidinas.

Em ambos os processos utilizados neste trabalho, extracção a partir de material vegetal (Capítulo 1) e síntese (Capítulo 2), a obtenção de polifenóis com um elevado grau de pureza exigem um complexo e moroso tratamento cromatográfico.

## Capítulo 1- Extracção e Isolamento de 3-Flavanóis das Grainhas da Uva

### 1- Introdução

As catequinas e as procianidinas encontram-se essencialmente nas partes sólidas do cacho da uva, sendo a sua concentração nas grainhas superior à das películas (De Freitas e Glories, 1999; Mateus *et al.*, 2001).

Durante a fase de maturação as grainhas contêm aproximadamente 77% das catequinas totais da uva, 81% das procianidinas oligoméricas e 60% das poliméricas. É de salientar também que nas grainhas prevalecem as formas polimerizadas das procianidinas relativamente às oligoméricas e às catequinas. Esta distribuição apesar de depender de muitos factores, apresenta-se semelhante entre as várias castas.

Vários trabalhos têm revelado que a procianidina B2 e o respectivo éster galato são as formas oligoméricas mais abundante nas grainhas, e que nas películas e nos engaços predomina a procianidina B1 (De Freitas *et al.*, 1998; Mateus *et al.*, 2001).

A extracção dos 3-flavanóis a partir do material vegetal é um procedimento de difícil execução experimental que depende de vários factores como o solvente, o tempo de extracção e a temperatura. Nas grainhas as procianidinas encontram-se na camada envolvente pelo que a extracção dos polifenóis não implica obrigatoriamente o esmagamento das sementes. A utilização de uma solução hidroalcoólica possibilita a dissolução dessa camada de gordura e a fácil remoção dos polifenóis presentes na camada exterior.

Dos métodos de purificação das procianidinas oligoméricas existentes na literatura, o método da precipitação selectiva por acção do hexano parece ser aquele que oferece melhores resultados (Michaud *et al.*, 1971).

Uma das técnicas mais frequentemente utilizadas na separação de compostos polifenólicos em função do grau de polimerização (peso molecular) é a *Cromatografia Líquida em Coluna a Baixa Pressão*, tendo como base a afinidade dos compostos para com a fase estacionária. Estudos realizados por Darné (1979), envolvendo a utilização de vários tipos de fase estacionária, demonstraram que o Fractogel TSK-HW 40(S)), conhecido actualmente por gel Toyopearl, proporcionava uma separação eficaz de moléculas de procianidinas com massa molecular compreendida entre  $10^2$  e  $10^4$  Daltons. Mais tarde outros autores utilizaram este tipo de gel para fraccionar as procianidinas oligoméricas das grainhas em função da massa molecular (De Freitas *et al.*, 1998)

O fraccionamento de compostos com um elevado grau de polimerização apresenta dificuldades de ordem experimental pelo facto destes formarem, com relativa facilidade,

complexos entre eles, com a fase estacionária e com o solvente, por estabelecimento de ligações de hidrogénio, hidrofóbicas e interações iónicas.

A separação dos vários isómeros com o mesmo grau de polimerização, isto é, as oito procianidinas diméricas e os trimeros, pode ser conseguida por *Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)*, utilizando um gel de sílica C18 ODS como fase estacionária (De Freitas *et al*, 1998). Esta técnica permite purificar estes diferentes compostos (HPLC-semipreparativa) e ainda proceder ao seu doseamento numa solução complexa (HPLC-analítico) com detecção do composto por espectrofotometria de UV (280 nm).

## 2- Material e Métodos

### 2.1- Extracção dos polifenóis das grainhas de uva

Das massas obtidas após esmagamento de uvas tintas e separação dos mostos para vinificação, separaram-se manualmente cerca de 1.3 Kg de grainhas.

As grainhas foram submersas em 4 L de uma solução aquosa de metanol a 80% contendo hidrogenossulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ , 0.1 g/L) como antioxidante. A mistura permaneceu à temperatura ambiente, sob agitação durante 65 h, por forma a maximizar a extracção dos 3-flavanóis. A solução de extracção foi renovada duas vezes (2 x 4 L) de modo a aumentar o rendimento do processo extractivo.

Após o termino de cada fase, a solução de extracção foi filtrada por lã de vidro e suplementada com antioxidante  $\text{NaHSO}_3$  (0.1 g/L). As soluções resultantes das 3 fases foram misturadas e concentradas no evaporador rotativo até cerca de 1.8 L (Temperatura  $<30^\circ\text{C}$ ). O extracto concentrado foi suplementado com nova porção de antioxidante (0.5 g/L) e conservado a  $-18^\circ\text{C}$ .

### 2.2- Precipitação selectiva das procianidinas oligoméricas com hexano

O extracto de procianidinas oligoméricas obtido (1.8 L) foi dividido em três porções (3 x 0.6 L) e cada uma delas foi submetida a diversos processos de extracção líquido-líquido com acetato de etilo e de precipitação com hexano de acordo com o esquema da Figura 11 (Michaud *et al.*, 1971).

Cada porção (600 mL) foi transferida para um funil de separação e procedeu-se à extracção dos polifenóis da fase aquosa com 3 x 150 mL de acetato de etilo. Obtiveram-se assim duas fases distintas: a *fase aquosa*<sub>1</sub>, que foi submetida a nova extracção com acetato de etilo, e a *fase orgânica*<sub>1</sub>, que continha grande parte dos polifenóis. Os vestígios de água presentes na *fase orgânica* recolhida foram eliminados por secagem com sulfato de sódio anidro. A solução orgânica foi filtrada e concentrada por evaporação até cerca de 100 mL. Adicionaram-se 40 mL de hexano à solução orgânica e verificou-se a formação de um precipitado (PP1), sem interesse neste trabalho, que corresponde às procianidinas mais polimerizadas. Após remoção do PP1 por filtração, adicionaram-se 180 mL de hexano ao sobrenadante e verificou-se a formação de um novo precipitado (PP2), correspondente aos monómeros e oligómeros.

A *fase aquosa*<sub>1</sub> recolhida foi concentrada até 20 mL e foi então submetida a nova extracção com 3 x 20 mL de acetato de etilo, obtendo-se assim a *fase aquosa*<sub>2</sub>, que foi submetida a nova

extracção com acetato de etilo e a *fase orgânica*<sub>2</sub>, que foi submetida a um processo de precipitação com hexano.

No final do processo juntaram-se os precipitados PP2, PP4 e PP6 obtidos a partir das três porções (3 x 0.6 L) e procedeu-se à purificação das procianidinas oligoméricas. O precipitado total foi redissolvido em 55 mL de acetato de etilo e novamente precipitado por adição de 85 mL de hexano. O precipitado correspondente às procianidinas oligoméricas foi centrifugado, liofilizado e conservado a -18°C. Os precipitados PP1, PP3 e PP5, referentes às procianidinas poliméricas foram rejeitados.

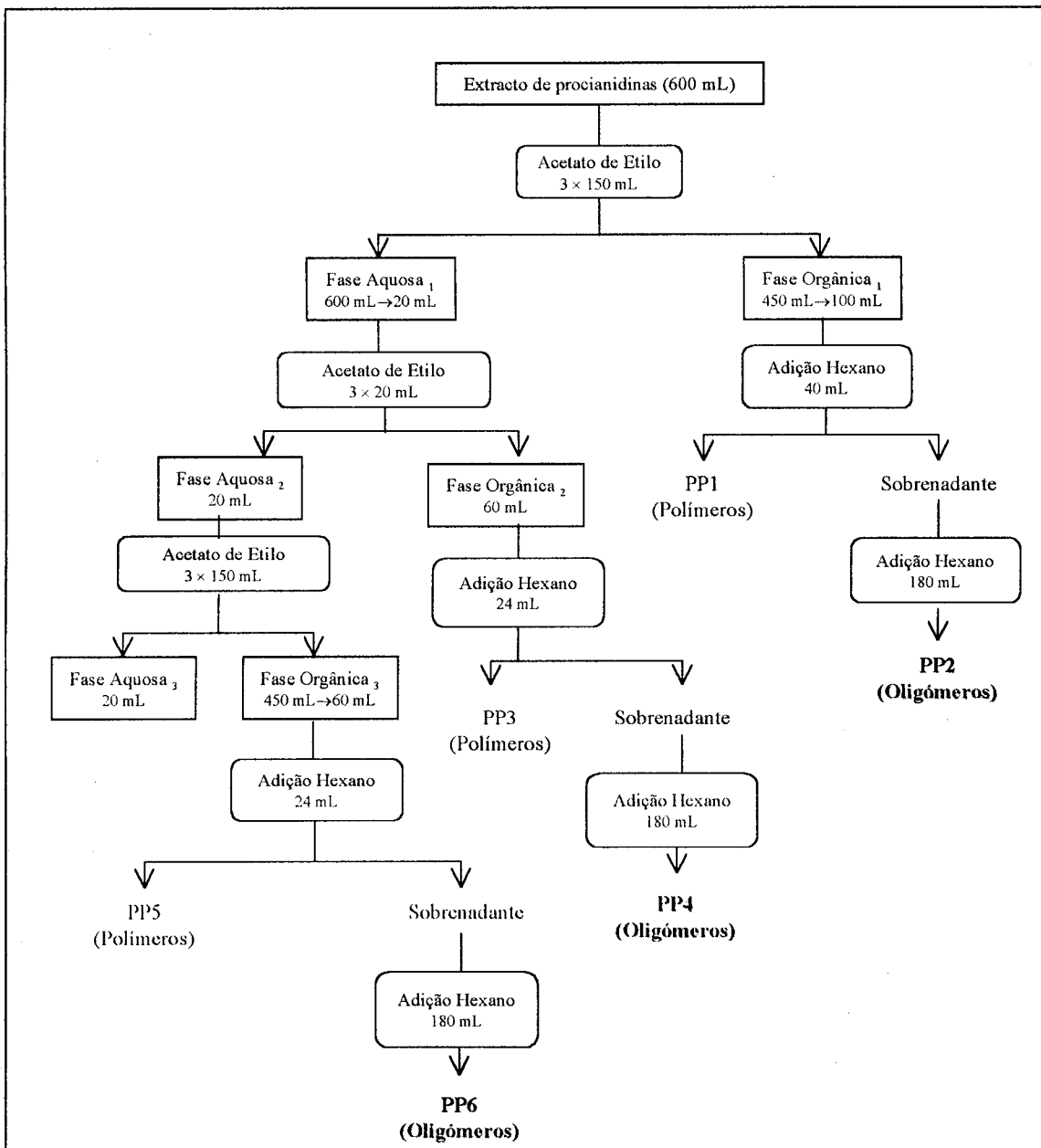


Figura 11- Esquema do isolamento das procianidinas oligoméricas por precipitação selectiva com hexano (PP- precipitado).

## 2.3- Purificação das catequinas e procianidinas oligoméricas por cromatografia

### 2.3.1- Fraccionamento por cromatografia líquida em gel Toyopearl

O precipitado correspondente às procianidinas oligoméricas foi dividido em pequenas porções que foram fraccionadas por cromatografia líquida em gel TSK Toyopearl HW 40(S) (30 x 1.5 cm) usando metanol como eluente (0.8 mL/min) segundo o método descrito na literatura (De Freitas *et al.*, 1998 (a)). A eluição das várias fracções foi seguida durante 9 h por detecção a 280 nm (comprimento de onda da absorção máximo dos 3-flavanóis) (Figura 12). Após a passagem de cada porção, a coluna foi lavada com uma solução aquosa de ácido acético a 10%, de modo a eliminar quase a totalidade dos polifenóis retidos, sendo em seguida condicionada novamente com metanol.

Cada uma das fracções identificadas no cromatograma da Figura 12 (F1 a F11) foi recuperada individualmente e analisada por HPLC-analítico por forma a determinar a sua composição polifenólica e identificar as fracções com compostos de interesse.

### 2.3.2- Isolamento das procianidinas oligoméricas por HPLC-semipreparativa

A composição das fracções foi determinada por HPLC-analítico e os diversos constituintes polifenólicos foram separados por HPLC-semipreparativa, utilizando para o efeito as seguintes condições cromatográficas:

- HPLC: Konik Instruments 500-B

Volume do injector (semipreparativa): 0.5 mL

Fase estacionária: 2 colunas C18-fase reversa colocadas em série

Fase móvel (gradiente de eluição na Tabela 2):

Solvente A- CH<sub>3</sub>COOH a 2.5% em H<sub>2</sub>O

Solvente B- (CH<sub>3</sub>COOH a 2.5% em H<sub>2</sub>O) a 20% em CH<sub>3</sub>CN (80%)

- Detector: UV-vis Konik Instruments, 204 com detecção a 280 nm

Tabela 2- Gradiente para separação das catequinas e procianidinas oligoméricas por HPLC.

Tempo/ minutos	% solvente A	% solvente B
0	93	7
5	93	7
90	80	20
105	0	100

### **2.3.3- Separação dos dímeros B1 e B3 por HPLC-semipreparativa**

Dada a ineficácia da separação dos dímeros B1 e B3 utilizando as condições atrás referidas, a sub-fracção referente à mistura dimérica B1/B3 foi submetida a nova separação por HPLC-semipreparativa sob outras condições. Após várias experiências com diferentes gradientes, utilizou-se um único solvente (isocrático) composto por 99% do solvente A e 1% do solvente B das condições anteriores (secção 2.3.2) (Figura 19).

### **2.3.4- Purificação dos compostos por cromatografia líquida em gel Toyopearl**

Todos os compostos isolados por HPLC-semipreparativa foram seguidamente purificados por passagem numa coluna de gel Toyopearl nas condições experimentais descritas em 2.3.1, utilizando metanol destilado como eluente. Esta etapa de purificação foi realizada sobretudo com o objectivo de eliminar vestígios de ácido acético provenientes dos eluentes utilizados na separação por HPLC. Seguidamente foi analisada a pureza de cada composto por HPLC-analítico com detecção no espectro do UV-vis (230-750 nm) utilizando para o efeito um detector DAD ("Diode-Array Detector").

É de salientar que, dada a sensibilidade dos compostos em causa face a reacções de oxidação, todo o seu manuseamento foi realizado ao abrigo da luz e com o mínimo contacto com o oxigénio.

Os compostos no estado puro foram liofilizados, pesados e redissolvidos em água desionizada e destilada. As soluções aquosas foram saturadas em argon e congeladas a -18°C.

### 3- Resultados e Discussão

Após a precipitação selectiva do extracto das grainhas (1.3 kg) com hexano obtiveram-se 2.458 g de procianidinas oligoméricas (PP2, PP4, PP6) e 8.223 g de procianidinas poliméricas (PP1, PP3, PP5).

O fraccionamento do extracto bruto de procianidinas oligoméricas por cromatografia em coluna (TSK gel) segundo o método descrito na literatura (De Freitas *et al*, 1998), permitiu isolar 11 fracções que diferem entre si pelo grau de polimerização dos seus constituintes (Figura 12, Tabela 3). As catequinas, as procianidinas diméricas e as triméricas foram identificadas com base nos tempos de retenção dos padrões obtidos por HPLC e no respectivo espectro de UV-vis (Figuras 13-18).

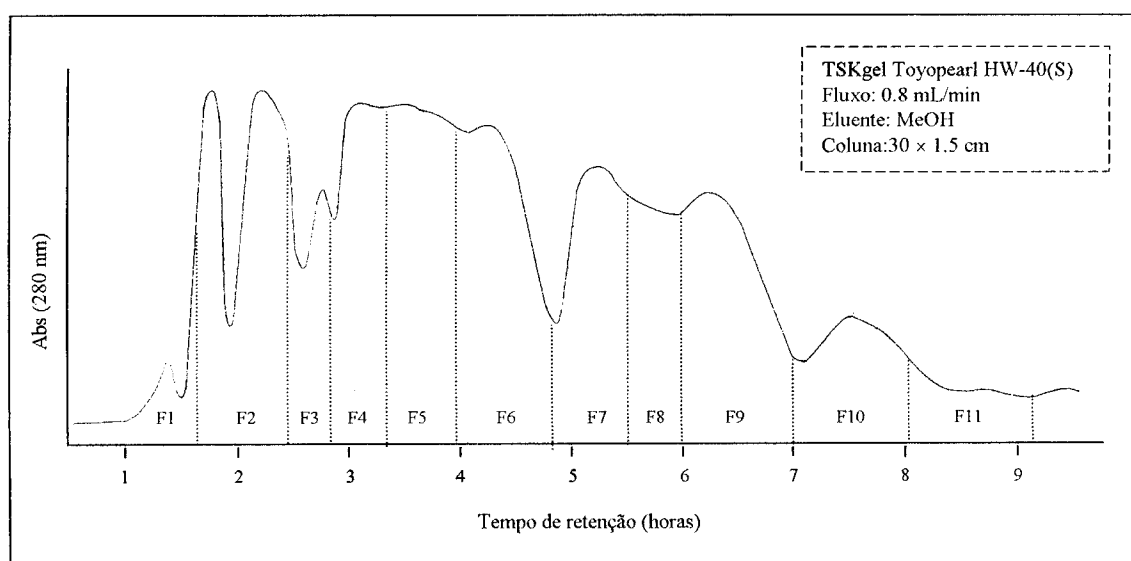


Figura 12- Cromatograma de baixa pressão (gel Toyopearl) referente ao fraccionamento das procianidinas oligoméricas extraídas de grainhas de uva.

A fracção F4 continha a grande maioria das procianidinas diméricas e a (-)-epicatequina-3-O-galato (Figura 16, Tabela 4). Por essa razão foi utilizada como fonte das procianidinas diméricas, as quais foram isoladas por HPLC-semipreparativa. O éster B2-galato foi isolado a partir da fracção F6 que era constituída essencialmente por este composto (Figura 18).

Os cromatogramas das fracções F7-F11, que correspondem ao tempo de eluição das procianidinas triméricas e tetraméricas (De Freitas *et al*, 1998 (a)) não são apresentados visto não ser possível identificar os picos cromatográficos por falta dos respectivos padrões e não foram objecto de estudo neste trabalho.

Tabela 3- Composição polifenólica das fracções obtidas por cromatografia em gel Toyopearl.

Extracto bruto de grainhas		
Fracção	Período de recolha/ horas	Composição polifenólica
F 1	0 – 1:40	Ácido cafeico, ácido gálico
F 2	1:40 - 2:18	Monómeros: (+)-catequina e (-)-epicatequina
F 3	2:18 - 2:38	Monómeros (vestigial)
F 4	2:38 - 3:13	<b>Dímeros, trímeros, (-)-epicatequina-3-O-galato</b>
F 5	3:13 - 3:56	Dímeros (vestigial)
F 6	3:56 - 4:44	<b>B2-3''-O-galato</b>
F 7	4:44 - 5:29	Trímeros, tetrameros
F 8	5:29 - 5:51	
F 9	5:51 - 7:03	
F 10	7:03 - 8:03	
F 11	8:03 - 9:09	

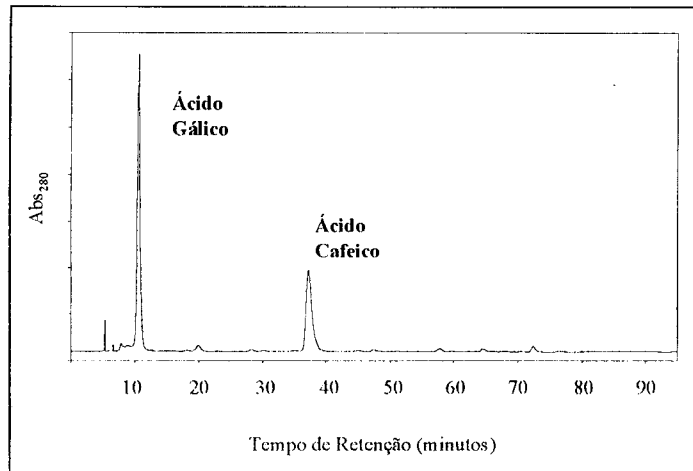


Figura 13- Cromatograma de HPLC da fracção F1 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna.

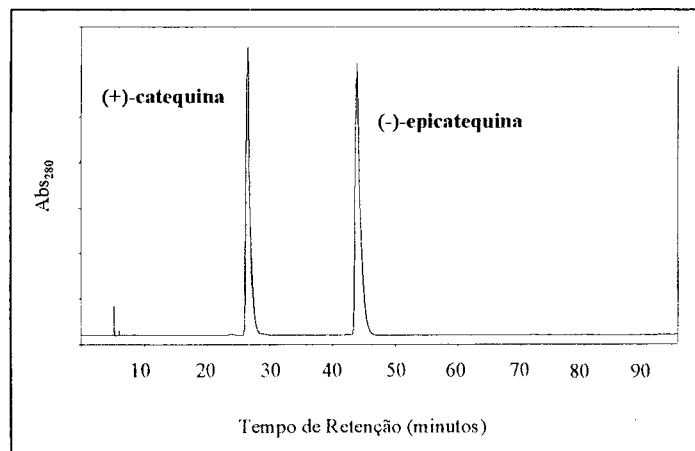


Figura 14- Cromatograma de HPLC da fracção F2 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna.

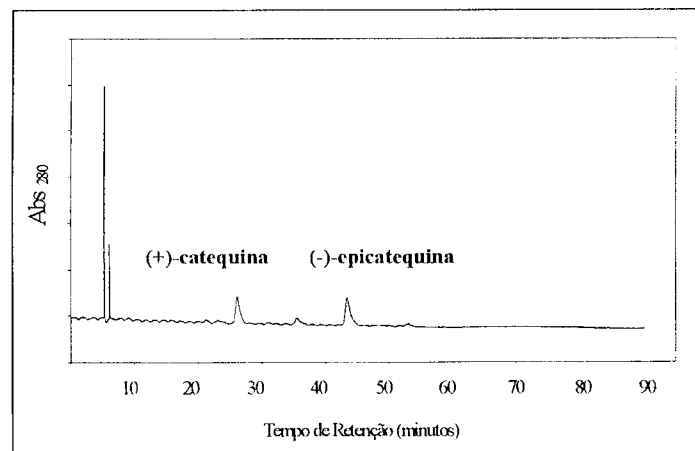


Figura 15- Cromatograma de HPLC da fracção F3 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna.

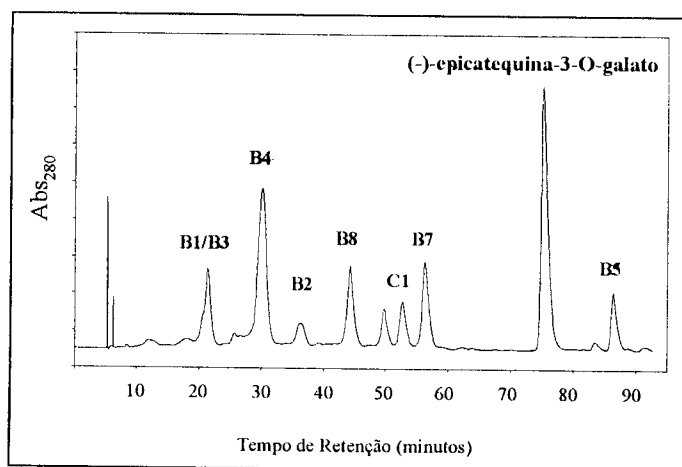


Figura 16- Cromatograma de HPLC da fracção F4 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna.

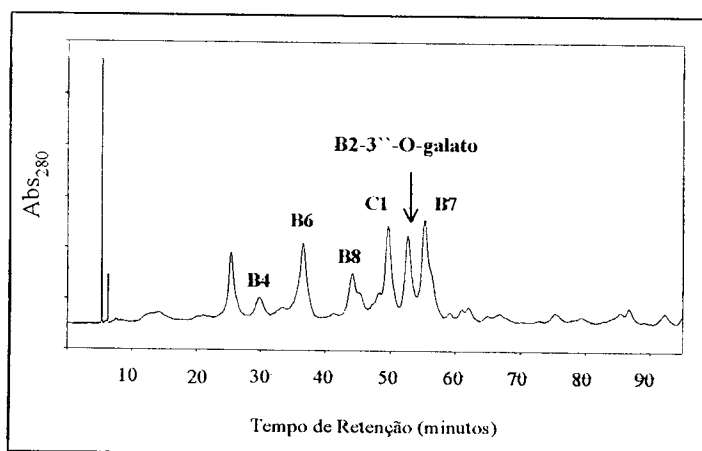


Figura 17- Cromatograma de HPLC da fracção F5 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna.

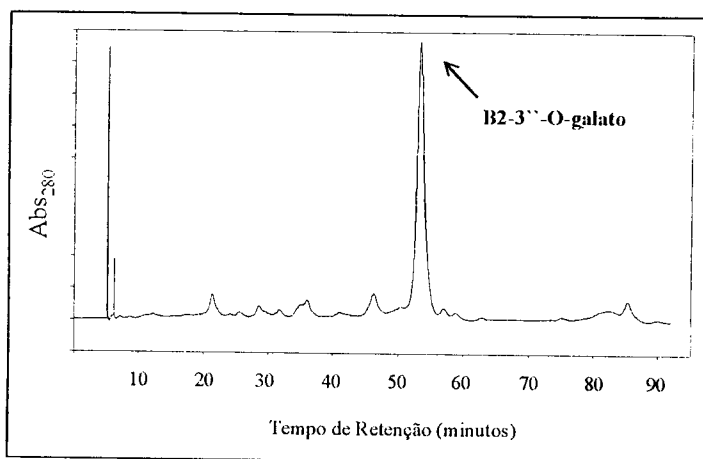


Figura 18- Cromatograma de HPLC da fracção F6 do extracto de grainhas obtida por cromatografia em coluna.

Tabela 4- Compostos fenólicos isolados da fracção F4 por HPLC-semipreparativa.

Fracção 4 – Extracto de grainhas	
Composto fenólico	Tempo de retenção (min)
Mistura dímeros B1/B3	18±2
Dímero B4	24±2
Dímero B2	32±2
Trímero C1	47±2
Dímero B7	51±1
Dímero B8	44±2
(-)-epicatequina-3-O-galato	64±2
Dímero B5	76±2

A mistura dos dímeros B1/B3 presente na fracção F4 foi fraccionada por HPLC-semipreparativa usando um solvente preparado para o efeito (secção 2.3.3) (Figura 19).

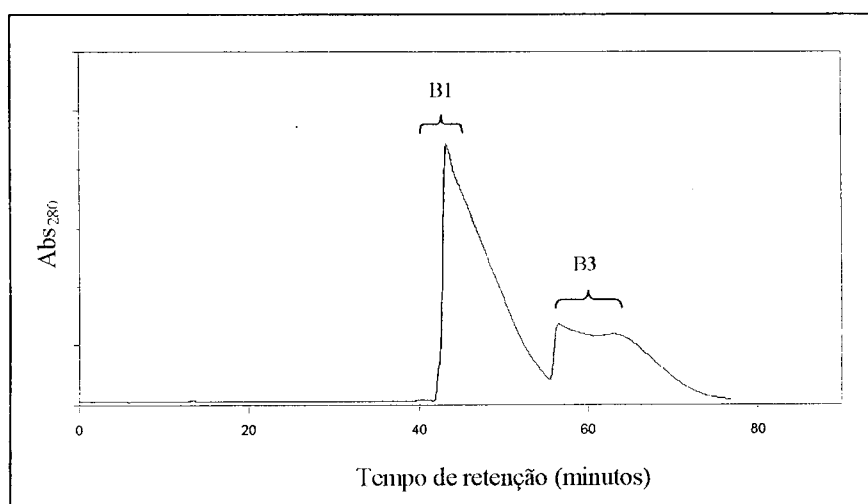


Figura 19- Cromatograma de HPLC-semipreparativa da subfracção B1/B3 isolada a partir da fracção F4.

Embora a separação dos picos não tenha sido completa foi possível obter os dímeros B1 e B3 puros, mesmo que em baixa quantidade.

O rendimento de extracção das diferentes classes de 3-flavanóis das grainhas de uva está indicado na Tabela 5.

Tabela 5- Rendimento do processo de extracção de procianidinas a partir das grainhas de uva (1.3 Kg).

3-Flavanóis	Massa/mg
Polímeros	8223
Oligómeros	2458
Catequinas	
(+)-catequina	1.2
(-)-epicatequina	7.9
(-)-epicatequina-3-O-galato	8.5
Dímeros	
B1	2.5
B3	6.2
B2	0.4
B4	16.6
B5	3.2
B6	4.1
B7	7.2
B8	5.3
B2-3''-O-galato	21.3
Total catequinas + dímeros	86.2

Dada a pequena quantidade dos dímeros B1 e B2 obtida, procedeu-se à obtenção destes por síntese química no Capítulo 2.

O baixo rendimento do processo de extracção das catequinas e procianidinas oligoméricas pode dever-se à sua oxidação durante o processo de isolamento, apesar de ter sido evitado ao máximo o contacto com o oxigénio e com a luz.

## Capítulo 2- Síntese de Procianidinas Naturais

### 1- Introdução

Na literatura estão descritos vários métodos de síntese dependendo do tipo de procianidina que se pretenda obter. No presente caso ir-se-á utilizar um método de síntese dos dímeros B1 (C4-C8) e B7 (C4-C6) que contêm a (-)-epicatequina como unidade superior e a (+)-catequina como unidade inferior.

A estratégia de síntese destas procianidinas adoptada neste trabalho tem como base um processo de condensação das unidades monoméricas (método convergente), envolvendo as seguintes etapas (Michaud *et al.*, 1973):

- acetilação dos monómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina;
- bromação do carbono C4 da unidade superior ((-)-epicatequina pentacetilada);
- condensação do carbono C4 da unidade superior com ao carbono C6 ou C8 da unidade inferior ((+)-catequina pentacetilada);
- desacetilação dos dímeros formados.

Apesar dos rendimentos descritos na literatura serem baixos, adoptou-se esta estratégia pela sua simplicidade e baixo custo.

### Mecanismo do processo de síntese dos dímeros B1 e B7:

#### Acetilação

Esta etapa tem como finalidade proteger os grupos hidroxilo pelo facto destes serem reactivos e facilmente oxidados a quinonas, evitando deste modo a sua degradação durante as restantes etapas da síntese. No presente caso, procedeu-se à sua acetilação a partir do anidrido acético (Figura 20).

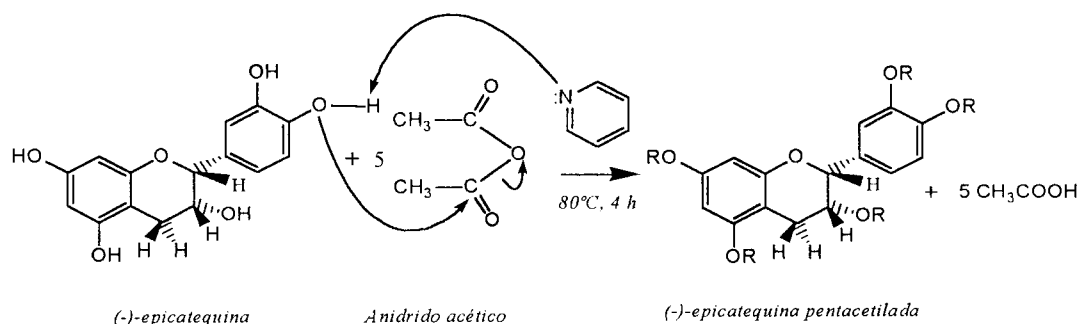


Figura 20- Mecanismo da reacção de acetilação dos monómeros de (-)-epicatequina (R, grupo acetilo).

### Bromação

A introdução de um átomo de bromo no carbono C4 da (-)-epicatequina pentacetilada aumenta o carácter electrofílico desse carbono, que se ligará ao carbono C6 ou C8 de outra unidade monomérica (inferior) (Figura 21).

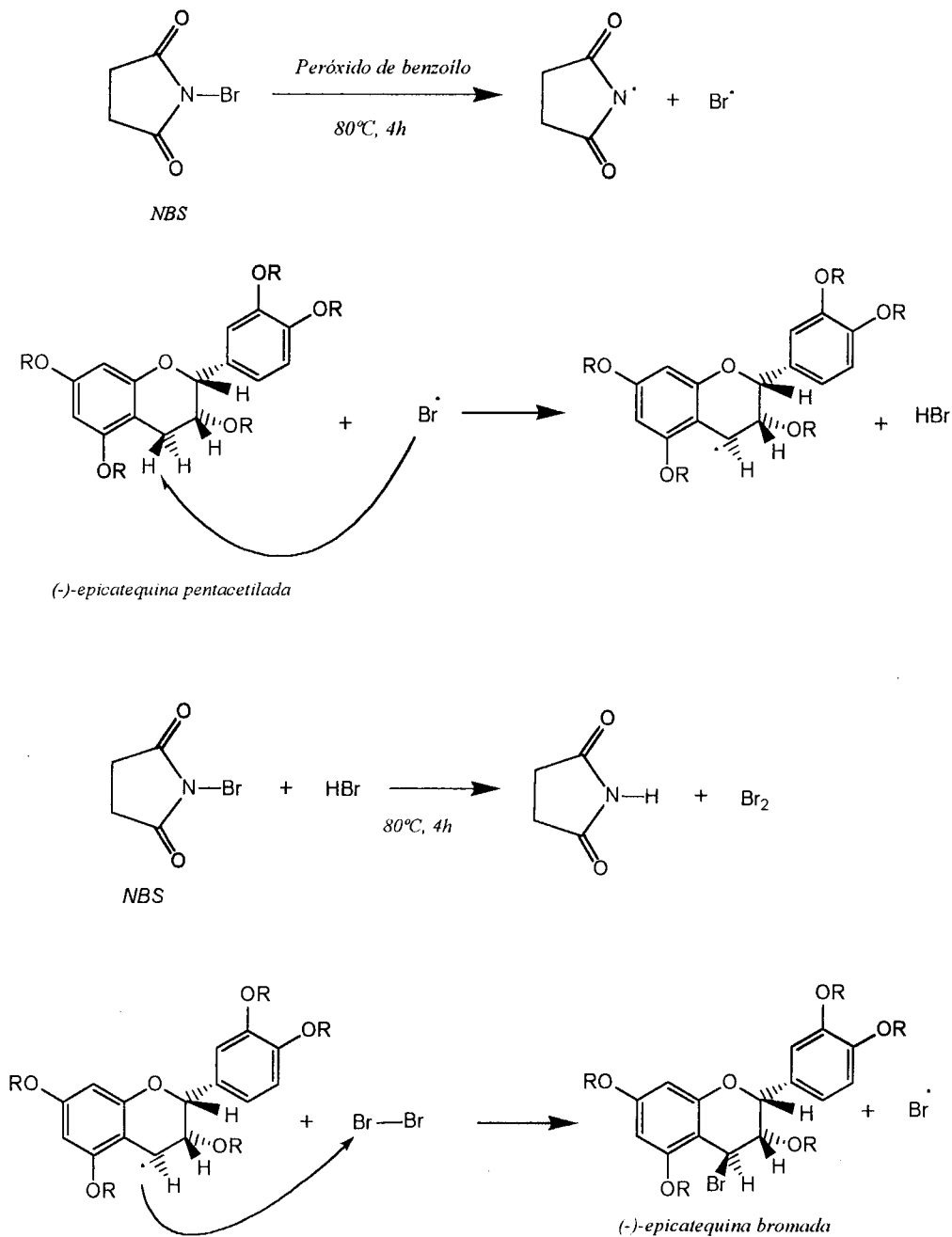


Figura 21- Mecanismo da reacção de bromação da (-)-epicatequina pentacetilada (R, grupo acetilo).

## Condensação

O zinco promove a remoção do bromo no carbono C4 e conseqüente formação do carbocátion nesta posição, o qual vai sofrer um ataque nucleofílico por parte do C6 (ou C8) do anel A da unidade inferior ((+)-catequina pentacetilada) (Figura 22). Da reacção resultam os dímeros B1 (C4-C8) e B7 (C4-C6) acetilados.

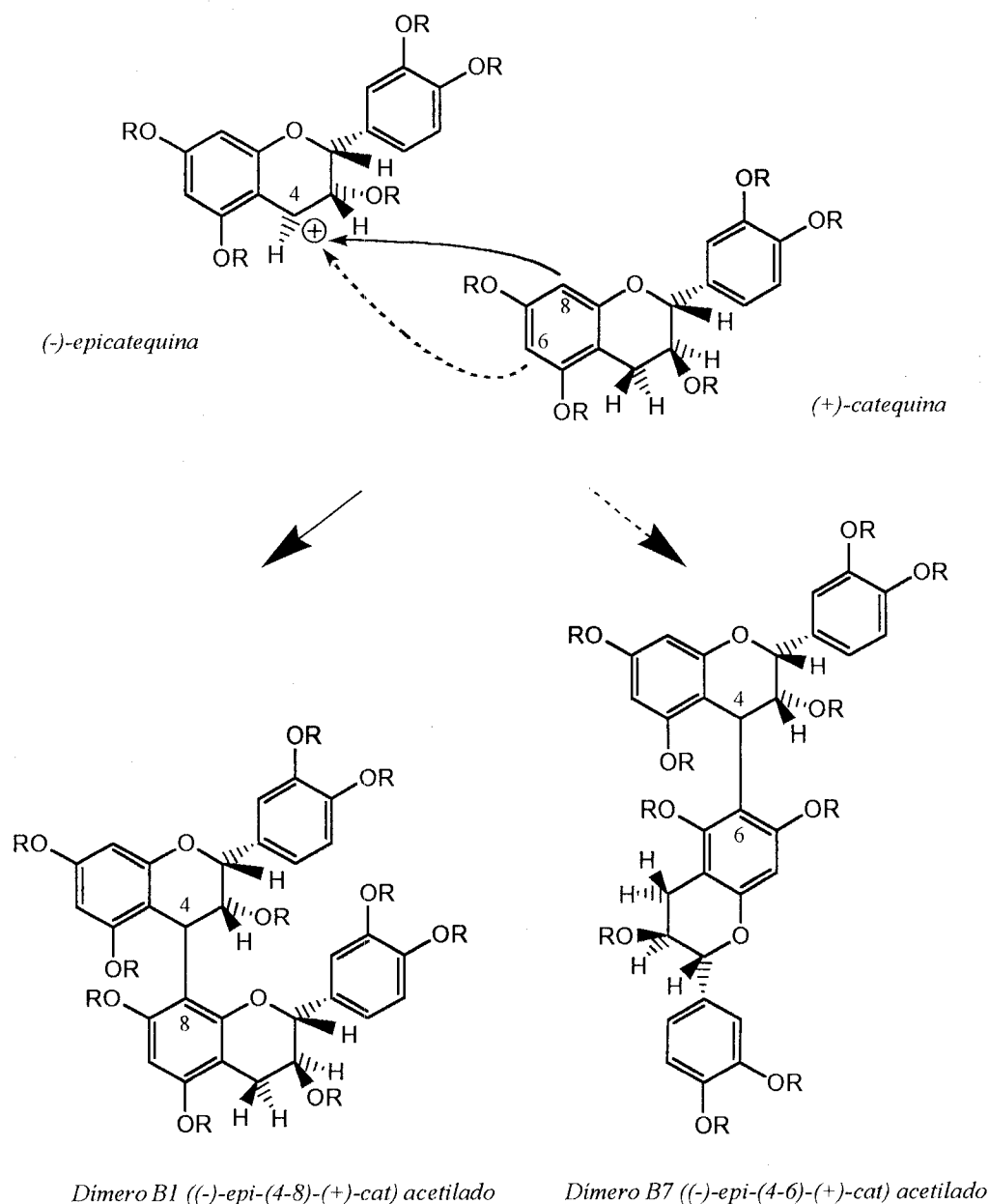


Figura 22- Mecanismo da reacção de condensação entre o derivado bromado da (-)-epicatequina pentacetilada e a unidade inferior (+)-catequina pentacetilada e a formação dos respectivos dímeros (R, grupo acetilo).

Para além da formação dos dímeros B1 e B7 acetilados, verifica-se a formação em menor quantidade dos estereoisómeros B2 ((-)-epi-(4-8)-(-)-epi) e B5 ((-)-epi-(4-6)-(-)-epi) acetilados. Isto deve-se ao facto da (-)-epicatequina bromada se decompor nos reagentes de partida originando o aparecimento da (-)-epicatequina acetilada a qual adiciona ao seu análogo bromado formando-se os dímeros B2 e B5 acetilados.

A condensação de um derivado bromado com os dímeros já formados pode ainda dar origem à formação de trímeros.

### Desacetilação

A remoção dos grupos acetilo protectores é conseguida em meio alcalino (Figura 23). Desta forma, os anéis aromáticos polifenólicos recuperam a sua estrutura original, tendo sido preservados os seus grupos característicos e consequentemente as suas propriedades funcionais.

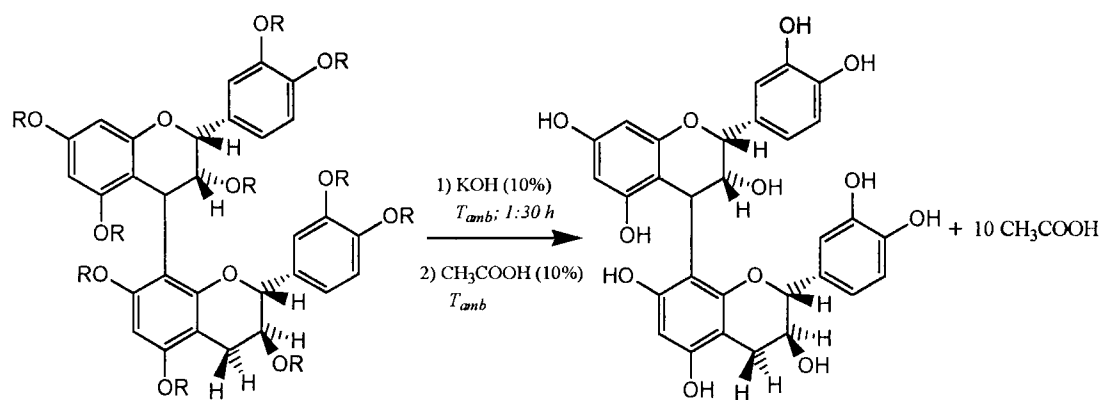


Figura 23- Reacção de desacetilação do dímero B1 acetilado (R, grupo acetilo).

## 2- Material e Métodos

### 2.1- Síntese de procianidinas usando (-)-epicatequina como unidade superior

#### 2.1.1- Acetilação

Dissolveram-se 500 mg de (-)-epicatequina (Aldrich®) em 10 mL de uma solução de anidrido acético/piridina (1:1, v/v), que foi em seguida saturada com argon. Esta solução permaneceu em repouso durante 56 h, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente a solução foi aquecida a 40°C, durante mais 16 h.

Em seguida adicionou-se água gelada (60 mL) e a mistura resultante foi arrefecida à temperatura de 5°C durante 1 h. Os cristais de (-)-epicatequina pentacetilada formados foram recuperados por filtração e em seguida purificados por recristalização com metanol. Foi realizado o mesmo procedimento para o monómero (+)-catequina (Aldrich®).

#### 2.1.2- Bromação

Num balão de fundo redondo dissolveram-se 400 mg de (-)-epicatequina pentacetilada em 55 mL de tetracloreto de carbono (p.a.), que em seguida foi saturado com argon.

A esta solução adicionaram-se 150 mg de NBS (N-bromosuccinimida) e 15.1 mg de peróxido de benzoilo aquoso (25%, m/v) e a mistura foi saturada com argon. O balão contendo a solução foi mantido rolhado num banho de óleo termostaticado a 80°C, durante 4 h sob agitação.

No final o balão foi arrefecido e formou-se um precipitado ((-)-epicatequina acetilada que não reagiu) que foi posteriormente removido por filtração sob vácuo. O filtrado foi evaporado à secura no evaporador rotativo e o resíduo resultante, correspondente ao derivado bromado, foi dissolvido em 40 mL de etanol (p.a.).

#### 2.1.3- Condensação

À solução alcoólica anterior foram adicionados 300 mg de (+)-catequina pentacetilada e 400 mg de zinco. A solução foi mantida em refluxo durante 60 min num banho de óleo. A solução depois de arrefecida foi filtrada e extraída com 3 x 40 mL de diclorometano.

A fase orgânica foi lavada com água e seca com sulfato de sódio anidro. Após remoção do agente exsiccante por filtração num filtro de pregas, o filtrado foi evaporado à secura e o resíduo dissolvido em 2 mL de metanol saturado com argon.

#### **2.1.4- Desacetilação**

À solução anterior, contendo as procianidinas diméricas e alguns trimeros acetilados, adicionaram-se 5 mL de uma solução de hidróxido de potássio 10% em metanol, previamente saturado em árgon. Esta solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, em atmosfera de árgon e protegida da luz durante 1:30 h. De seguida adicionaram-se 25 mL de água destilada, gelada, e previamente saturada em árgon. O pH da solução foi ajustado a 4.0 com ácido acético a 10%. Os compostos desacetilados foram em seguida extraídos com acetato de etilo (4 x 15 mL).

A fase orgânica obtida foi evaporada à secura e dissolvida em metanol para posterior fraccionamento e purificação por cromatografia em coluna de baixa pressão.

Dada a sensibilidade dos compostos em estudo face a reacções de oxidação, em todas as etapas foi evitado ao máximo o contacto com oxigénio e a exposição destes à luz, nunca os submetendo a temperaturas superiores a 30°C.

#### **2.2- Isolamento dos oligómeros sintetizados**

As procianidinas resultantes do processo de síntese foram submetidas a um longo processo de fraccionamento e purificação por cromatografia líquida em coluna de gel TSK Toyopearl HW 40(S), seguida por HPLC-semipreparativa, idêntico ao descrito na secção 2.3. do Capítulo 1. Os compostos depois de purificados foram liofilizados, pesados e redissolvidos em água destilada e desionizada. As soluções foram saturadas com árgon e armazenadas a -18°C.

### 3- Resultados e Discussão

O cromatograma do fraccionamento da solução resultante da síntese numa coluna de gel TSK Toyopearl HW 40(S), está representado na Figura 24.

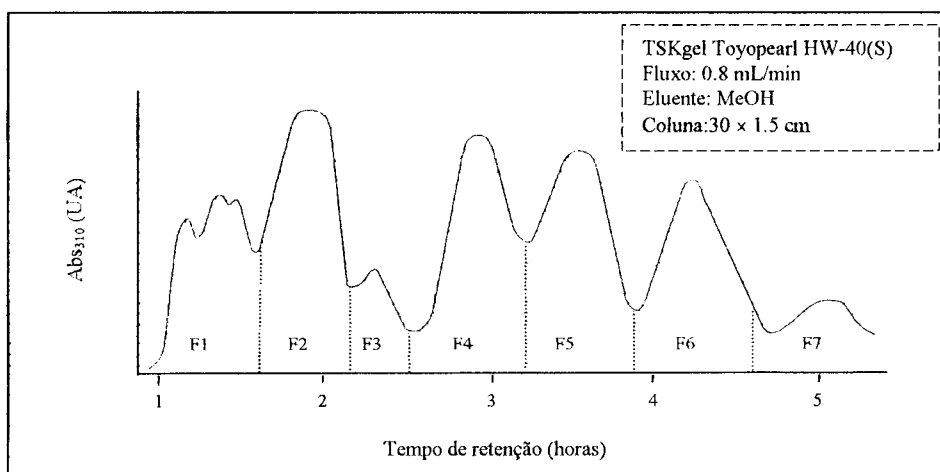


Figura 24- Cromatograma de baixa pressão (gel Toyopearl) referente ao fraccionamento das procianidinas sintetizadas.

Cada fracção identificada no cromatograma da Figura 24 (F1-F7) foi analisada por HPLC-analítico (Figuras 25-27) e alguns dos compostos presentes nessas fracções foram identificados com base nos tempos de retenção e espectros de UV-vis por comparação com os respectivos padrões (Tabela 6).

Tabela 6- Composição polifenólica das fracções identificadas no cromatograma da Figura 24.

Extracto bruto de síntese		
Fracção	Tempo de recolha (h)	Composição Polifenólica
F1	0-1:40	Produtos secundários
F2	1:40-2:30	Monómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina
F3	2:30-2:38	Monómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina
<b>F4</b>	<b>2:38-3:13</b>	<b>Dímeros B1, B2</b>
<b>F5</b>	<b>3:13-3:56</b>	<b>Dímeros B7, B5</b>
<b>F6</b>	<b>3:56-4:44</b>	<b>Trímeros</b>
F7	4:44-5:29	Trímeros

As fracções **F4** e **F5**, contendo respectivamente as procianidinas diméricas C4-C8 e C4-C6, foram misturadas e submetidas a um fraccionamento por HPLC-semipreparativo nas condições descritas na secção 2.3.2. do Capítulo 1. Os dímeros das fracções F4 e F5 e os trimeros da fracção F6 depois de separados foram purificados por cromatografia em coluna de gel TSK Toyopearl de forma idêntica à descrita em 2.3.4. do Capítulo 1, e a sua pureza analisada por HPLC-analítico.

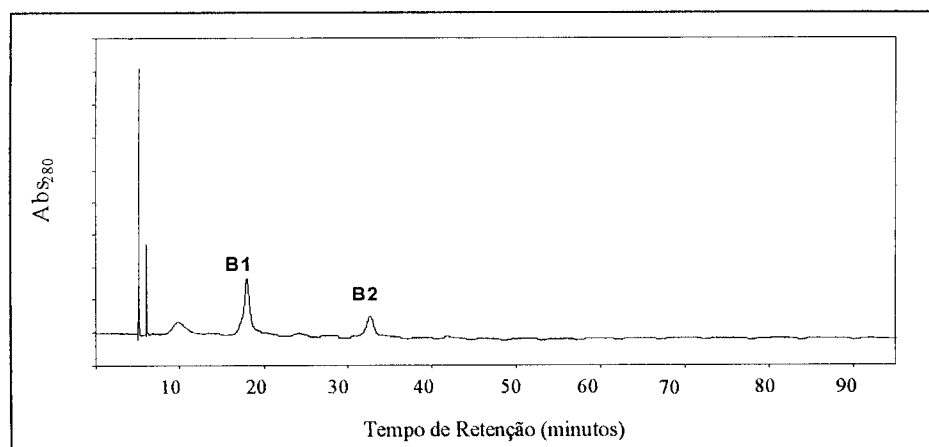


Figura 25- Cromatograma de HPLC da fracção F4 correspondente aos dímeros do tipo C4-C8 sintetizados.

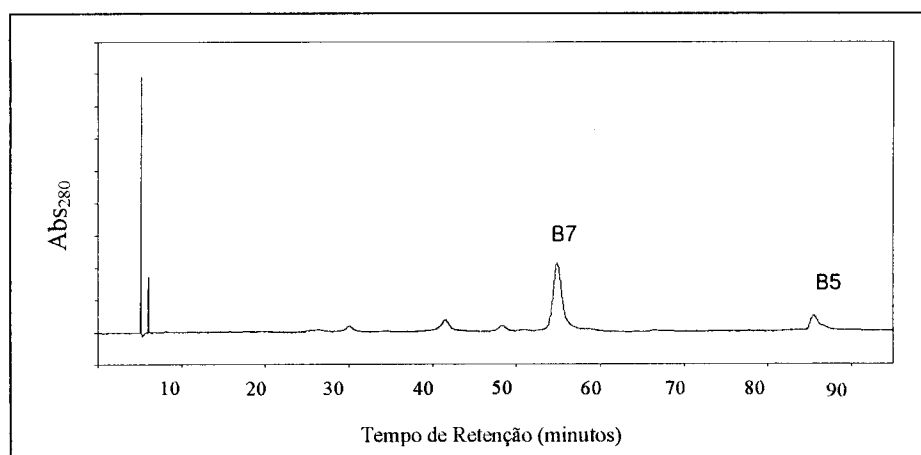


Figura 26- Cromatograma de HPLC da fracção F5 correspondente aos dímeros do tipo C4-C6 sintetizados.

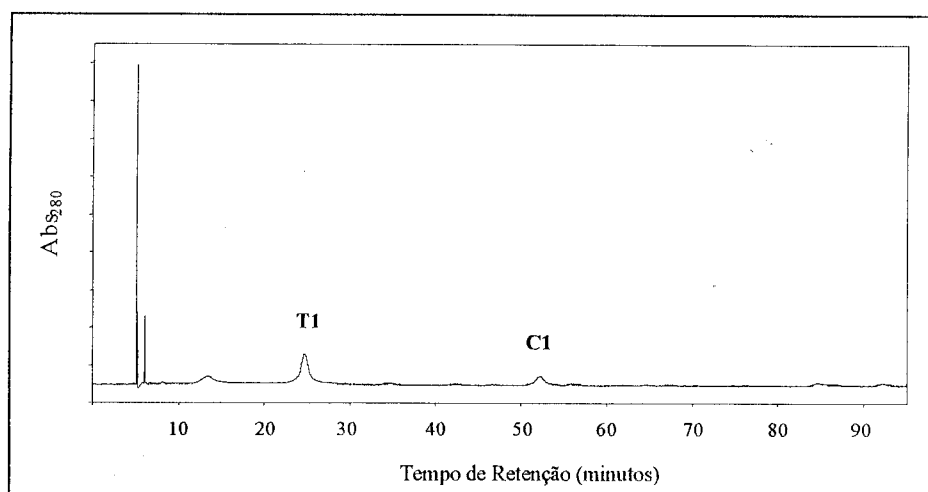


Figura 27- Cromatograma de HPLC da fracção F6 correspondente aos trimeros sintetizados.

Tabela 7- Massa e Rendimento das procianidinas obtidas por síntese.

Composto Polifenólico	Massa/mg	Rendimento/%
Dímero B1	4.4	1.1
Dímero B2	7.7	2.2
Dímero B5	2.6	0.7
Dímero B7	3.3	0.9
Trímero C1	0.5	0.1
Trímero T1	4.5	0.9

Os baixos rendimentos obtidos neste processo de síntese, aliás já referido por outros autores (Michaud *et al.*, 1973; De Freitas 1665) (Tabela 7) podem ser explicados pela elevada instabilidade destes compostos que se oxidam muito facilmente na presença de oxigénio e sobretudo em meio alcalino. A última etapa deste processo de síntese realizada a um pH muito elevado ( $\text{pH} > 11$ ) poderá estar na origem das pequenas quantidades de dímeros obtidas, apesar do cuidado em trabalhar numa atmosfera de árgon e na ausência de luz.

— PARTE 2 —

**ESTUDO *IN VITRO* DA ACTIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DE CATEQUINAS E  
PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS FACE À  
OXIDAÇÃO DAS LDL HUMANAS**

## Parte 2- Estudo *in vitro* da Actividade Antioxidante das Catequinas e Procianidinas Oligoméricas face à Oxidação das LDL Humanas

### 1- Introdução

Neste trabalho escolheu-se como modelo biológico experimental a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humanas, fenómeno que está associado ao desenvolvimento da arteriosclerose. A utilização deste modelo biológico tem como objectivo simular a actuação localizada dos polifenóis que se pretendem estudar. No entanto, é preciso ter em consideração que este e outros modelos de estudo *in vitro* não atendem à biodisponibilidade destes compostos quando ingeridos na alimentação, nem ao seu metabolismo no organismo, sendo por isso os resultados bastante limitados.

Os trabalhos *in vitro* surgem como uma alternativa aos estudos *in vivo* que são por vezes difíceis de pôr em prática dada a sua complexidade e dificuldade de obtenção de biomarcadores eficazes das moléculas que se pretendem estudar.

Inúmeros ensaios *in vitro*, citados na literatura, têm revelado que os compostos polifenólicos, abundantes na nossa dieta, possuem uma elevada actividade antioxidante face a variados substratos. No entanto, grande parte destes trabalhos centram-se no estudo de compostos de baixo peso molecular disponíveis comercialmente, ou de uma mistura indiferenciada de polifenóis (Bors e Saran, 1987; Sichel *et al.*, 1991; Kitagawa *et al.*, 1992; Frankel *et al.*, 1993, 1995; Jovanovic *et al.*, 1994; Teissedre *et al.*, 1995; Vinson e Hontz, 1995; Fogliano *et al.*, 1999; Laranjinha e Cadenas, 1999; Ivanov *et al.*, 2001).

Apesar de ser reconhecido que as procianidinas apresentam uma actividade biológica, existem poucos trabalhos na literatura que citam a contribuição individual de cada procianidina, e estes trabalhos em geral não envolvem substratos biológicos (Ariga e Hamano, 1990; Ricardo da Silva *et al.*, 1991 (b); Plumb *et al.*, 1998; Gaulejac *et al.*, 1999 (a), (b)).

Neste trabalho estudou-se o efeito de diferentes características estruturais das catequinas e procianidinas isoladas na Parte 1 na sua actividade antioxidante face à oxidação das LDL humanas. As características estudadas foram as seguintes:

- tipo de unidade monomérica: (+)-catequina e (-)-epicatequina;
- tipo de ligação interflavonóide das procianidinas diméricas (C4-C6 e C4-C8);

- grau de polimerização (monómero, dímero, trímero);
- esterificação com o ácido gálico.

Neste estudo utilizaram-se diferentes metodologias com o objectivo de estudar diferentes fases do processo de oxidação das LDL: I- o *estado inicial* pela medição da **fluorescência de uma sonda (ácido cis-parinário)** altamente sensível à oxidação e previamente incorporada nas partículas lipoproteicas; II- o *estado intermédio* pela medição do **consumo de oxigénio** resultante da actividade oxidante do radical iniciador; III- o *estado mais avançado* de oxidação pela medição da **absorvância (234 nm) dos dienos conjugados**, produtos da peroxidação lipídica (Laranjinha *et al.*, 1992, 1994; Serafini *et al.*, 2000).

## 1.1- As Lipoproteínas

As lipoproteínas de baixa densidade, LDL (“low density lipoproteins”), desempenham um papel preponderante no nosso organismo sendo as responsáveis pelo transporte do colesterol plasmático do fígado para os tecidos periféricos. Estas partículas quando sujeitas a um stress oxidativo estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento de arteriosclerose e problemas cardio- e cerebrovasculares.

### 1.1.1- Biossíntese das lipoproteínas

No organismo humano existem vários tipos de lipoproteínas que podem ser classificadas em função da sua densidade (Tabela 8).

O colesterol, esterificado e livre, e os triacilglicéridos (TAGs) provenientes da dieta são incorporados, ao nível do intestino, em lipoproteínas denominadas *quilomicrons* (densidade: <0.94; diâmetro: 80-500 nm) que são secretadas na linfa e entram no sistema circulatório. Os TAGs destas partículas lipoproteicas são digeridos por enzimas específicas, as lipoproteínas lipases, que se encontram aderidas às células endoteliais dos capilares do tecido adiposo e dos músculos. Os ácidos gordos constituintes dos TAGs são então libertados e entram nos adipócitos onde sofrem esterificação, originando novamente TAGs que são oxidados para produção de energia ou armazenados.

As quilomicrons, agora quase desprovidas de triacilglicéridos, dissociam-se do endotélio capilar e entram novamente em circulação. Formam-se assim as *quilomicrons remanescentes* (diâmetro 30-50 nm). Quando atingem o fígado, estas são reconhecidas por receptores específicos

e são internalizadas por endocitose. No interior das células hepáticas, as enzimas lisosomais hidrolisam os ésteres de colesterol presentes nas lipoproteínas e originam colesterol livre. O colesterol livre pode ser usado na biossíntese de membranas, armazenado no fígado como ésteres de colesterol, excretado como ácidos biliares ou, quando presente em excesso, integrado em lipoproteínas endógenas, as *VLDL* (“very low density lipoproteins”; densidade: <1.006; diâmetro 30-80 nm) que são posteriormente secretadas no plasma.

Os TAGs das *VLDL* são clivados nos capilares pela lipoproteína lipase e formam-se as *VLDL* remanescentes designadas *IDL* (“intermediate density lipoproteins”; densidade: 1.006-1.019; diâmetro: 25-35 nm), constituídas predominantemente por ésteres de colesterol endógenos. As *IDL* têm dois destinos: algumas são recrutadas pelo fígado e seguem uma das três vias anteriormente citadas, ou permanecem em circulação e dão origem às *LDL* (“low density lipoproteins”; densidade: 1.019-1.063; diâmetro: 18-28 nm) por remoção dos TAGs ainda presentes, a cargo da lipoproteína lipase.

As *LDL* possuem um tempo de semi-vida de 1.5 dias e constituem o maior reservatório de colesterol no plasma humano (60-70% do total). Quando o fígado ou os tecidos extrahepáticos necessitam de colesterol para a síntese de membranas, hormonas esteróides ou ácidos biliares, eles sintetizam receptores específicos de *LDL* e obtêm o colesterol por endocitose. Quando já não é necessário colesterol a síntese de receptores é inibida.

Quando as células morrem e as membranas se degradam, o colesterol livre é libertado no plasma e é imediatamente incorporado pelas *HDL* (“high density lipoprotein”; densidade: 1.063-1.21; diâmetro: 5-12 nm), onde é esterificado com um ácido gordo de cadeia longa pela enzima lecitina colesterol aciltransferase. Desta forma o colesterol é removido das células periféricas para o fígado, onde é eliminado.

Enquanto as *LDL* transportam o colesterol proveniente da dieta do fígado para os tecidos periféricos, onde é utilizado na biossíntese de membranas plasmáticas ou armazenado sob a forma de triacilglicéridos (TAG), as *HDL* têm como função o processo inverso, isto é, transportam o excesso de colesterol das artérias para o fígado onde este é eliminado.

Tabela 8- Classificação, composição e funções biológicas das diversas lipoproteínas (TAG, triacilglicérido) (adaptado de Stryer, 1995).

Lipoproteínas	Conteúdo lipídico	Função/Destino	Densidade
⇒ Quilomicrons	TAG e colesterol	Hidrólise pela lipoproteína lipase	<0.94
⇒ Quilomicrons remanescentes	Ésteres de colesterol	Endocitose no fígado	-
⇒ VLDL:Lipoproteínas de muito baixa densidade	Triacilglicéridos	Transporte de colesterol e TAG em excesso do fígado	<1.006
⇒ IDL:Lipoproteínas de densidade intermédia	Ésteres de colesterol	Endocitose no fígado e conversão em LDL	1.006-1.019
⇒ LDL:Lipoproteínas de baixa densidade	Ésteres de colesterol Fosfolípidos	Transporte de colesterol para tecidos periféricos	1.019-1.063
⇒ HDL:Lipoproteínas de alta densidade	Ésteres de colesterol	Transferência de ésteres de colesterol para IDL e LDL	1.063-1.21

### 1.1.2- Composição das LDL

As LDL possuem um núcleo hidrofóbico constituído por lípidos, nomeadamente ésteres de colesterol, e uma camada hidrofílica circundante composta por lípidos polares (fosfolípidos e colesterol não esterificado) e apoproteínas (Figura 28). A componente proteica das LDL, a apoproteína B-100, constitui um epítipo que permite o seu reconhecimento por receptores membranares específicos e consequentemente a sua internalização celular.

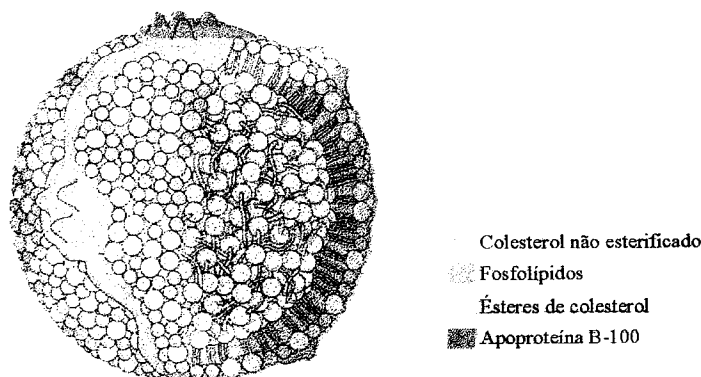


Figura 28- Modelo esquemático de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Stryer, 1995).

As LDL contêm ácidos gordos polinsaturados (PUFAs “polyunsaturated fatty acids”), sendo o ácido linoleico o mais abundante (aproximadamente 85% dos lípidos totais). Estas lipoproteínas possuem também antioxidantes de natureza lipofílica tais como: o  $\alpha$ -tocoferol, que é o mais abundante (6 moléculas/unidade), o  $\beta$ -tocoferol, o  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, o licopeno, o ubiquinol-10 e outros menos abundantes (Esterbauer *et al.*, 1992).

## 1.2- A Oxidação das LDL

### 1.2.1- Desenvolvimento da arteriosclerose

Um desequilíbrio entre a quantidade de LDL e HDL circulantes no plasma, mais precisamente um aumento de LDL e diminuição de HDL, provoca a acumulação de colesterol nas artérias e uma possível obstrução destas, constituindo um sério risco de arteriosclerose. Para além da quantidade, o estado de oxidação das LDL constitui também um factor de risco. A exposição do organismo ao constante stress oxidativo provoca a oxidação dos ácidos gordos insaturados, e das proteínas constituintes das LDL, e uma modificação irreversível destas lipoproteínas, impedindo a sua internalização pelas células, com conseqüente acumulação nas artérias.

A oxidação das LDL pode ter várias origens (Steinberg *et al.*, 1989):

- incorporação de lípidos já oxidados nas LDL, que promovem a propagação da oxidação;
- oxidação dos ácidos gordos insaturados (LH) presentes nas LDL por contacto com as células receptoras ou outro agente oxidante (radicais livres de oxigénio, metais de transição, ...);
- actuação do sistema imunitário.

As lipoproteínas quando oxidadas sofrem assim profundas modificações estruturais que impedem o reconhecimento das LDL pelos receptores específicos celulares e a sua internalização nas células (Steinberg *et al.*, 1989):

- fragmentação da apoproteína B-100 (epítipo específico);
- aumento da carga negativa;
- aumento da densidade (>1.07);
- diminuição do teor em ácidos gordos insaturados;
- aumento do nível de formas oxidadas.

A Figura 29 retrata as várias etapas do desenvolvimento da arteriosclerose propostas por Steinberg (1989).

A **citotoxicidade** da forma oxidada das LDL fragiliza a integridade do tecido endotelial (I) que reveste os vasos capilares, favorecendo a penetração das LDL, oxidadas ou não, para o espaço sub-endotelial. Aqui, as LDL ainda não oxidadas podem sofrer oxidação por contacto com radicais livres ou outros oxidantes (II). As LDL já oxidadas sofrem uma oxidação mais extensa e funcionam como um **factor quimioatractivo** face aos monócitos circulantes, promovendo a passagem destes para o espaço sub-endotelial (III). As LDL oxidadas são endocitadas pelos macrófagos e formam-se **células esponjosas** (IV). A modificação oxidativa da apoproteína B-100 provoca ainda uma **inibição da mobilidade dos monócitos residentes**, e consequentemente a adesão destes às paredes vasculares (V). Ocorre assim uma deposição de placas arterioscleróticas nas paredes do sistema circulatório que provocam a sua obstrução, progredindo-se no sentido do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

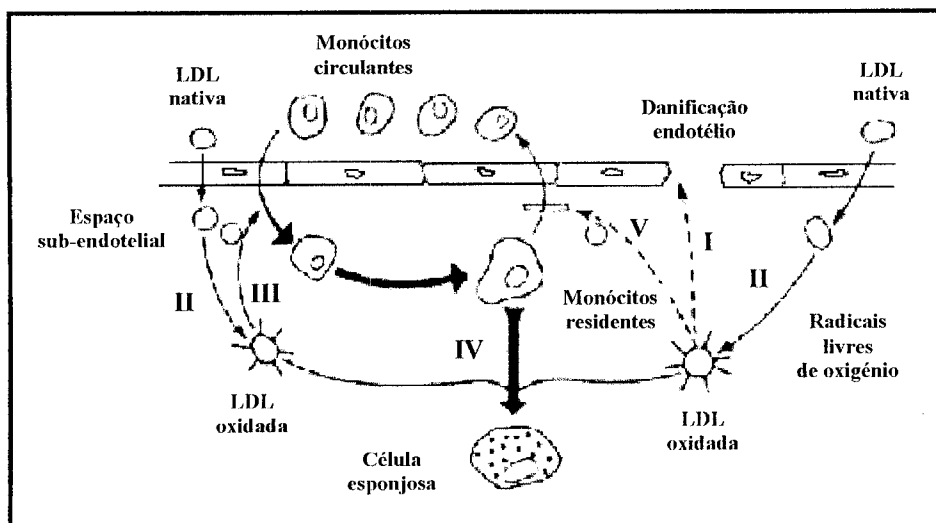


Figura 29- Mecanismos de oxidação das LDL e desenvolvimento de arteriosclerose (Steinberg *et al.*, 1989).

### 1.2.2- Mecanismo e produtos da autooxidação das LDL

Como foi referido anteriormente a peroxidação dos ácidos gordos insaturados (LH) constituintes das LDL parece estar na origem da arteriosclerose.

O mecanismo de peroxidação lipídica pode ser descrito essencialmente em 3 fases: iniciação, propagação e terminação (Figura 30). A etapa de iniciação é provavelmente a mais difícil de

definir devido ao elevado número de radicais que podem intervir e remover o átomo de hidrogénio do substrato LH. O agente iniciador (In) pode ser um ião metálico, um radical gerado por fotólise, por decomposição de um hidropéroxido, por irradiação de elevada energia, ou de outra origem, etc. No caso das LDL, como estas são pouco porosas, os radicais iniciadores não têm capacidade de penetrarem no seu interior e reagem com a cadeia carbonada de um ácido gordo insaturado (LH) constituinte da membrana das LDL, removendo-lhe um átomo de hidrogénio. Os ácidos gordos insaturados apresentam-se como substratos preferenciais da oxidação dada a sua baixa energia de ligação relativamente aos ácidos saturados. Após a remoção do átomo de hidrogénio, o radical alquilo formado ( $L^{\bullet}$ ) sofre uma deslocalização electrónica e dá origem a duas estruturas de ressonância radicalares (Figura 31). Cada uma delas pode reagir com uma molécula de oxigénio e originar um radical peroxilo ( $LOO^{\bullet}$ ). Este radical é capaz de remover um átomo de hidrogénio de outra cadeia carbonada lipídica (LH) e formar um hidroperóxido ( $LOOH$ ) com ligações duplas conjugadas (Figuras 30 e 31). O novo radical alquilo gerado ( $L^{\bullet}$ ) recomeça um novo ciclo de propagação da oxidação.

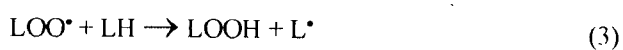
A etapa de terminação pode envolver a reacção entre duas espécies radicalares da qual resulta a neutralização de ambas (terminação não inibida), ou a actuação de antioxidantes (terminação inibida). Os antioxidantes (AH) são capazes de neutralizar, mais ou menos eficazmente, os radicais peroxilo dando origem a um radical, que por reacção com outro radical, provoca a formação de espécies não reactivas.

Da peroxidação lipídica resultam vários produtos: os primários, como é o caso dos hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas, e os secundários, como os aldeídos 4-hidroxinonenal (4-HNE) e malonaldeído (MDA), cetonas, etc.

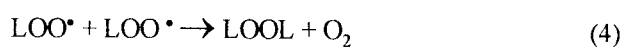
Iniciação



Propagação



Terminação não inibida



Terminação inibida

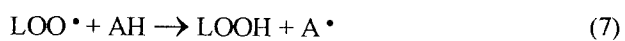


Figura 30– Mecanismo geral da peroxidação lipídica (LH, ácido gordo insaturado;  $\text{L}^\bullet$ , radical alquilo;  $\text{LOO}^\bullet$ , radical peroxilo;  $\text{LOOH}$ , hidroperóxido;  $\text{In}^\bullet$ , radical iniciador;  $\text{InH}$ , forma reduzida do radical iniciador;  $\text{AH}$  e  $\text{A}^\bullet$ , formas reduzida e oxidada do antioxidante).

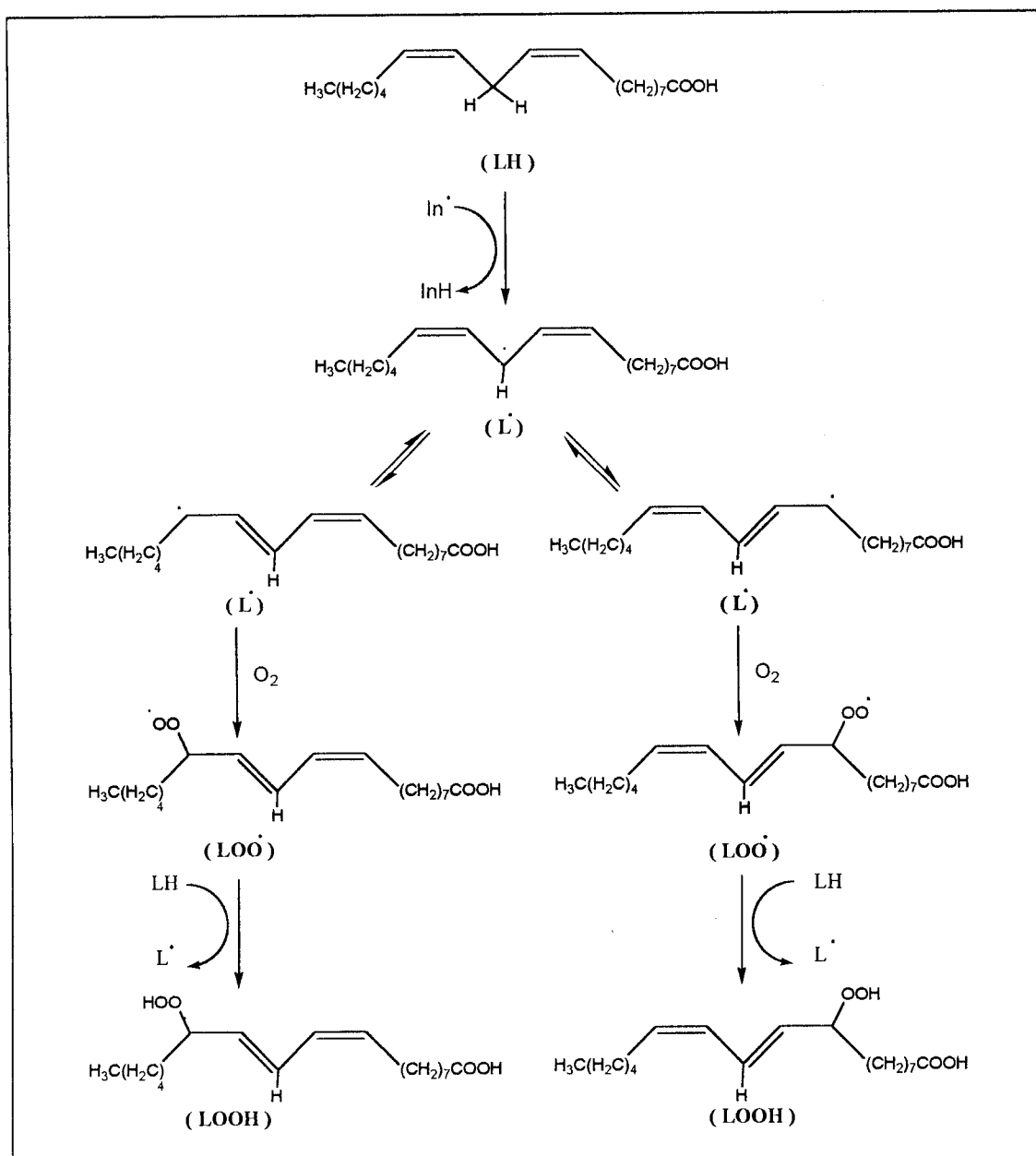


Figura 31- Mecanismo de peroxidação lipídica do ácido linoleico (LH, ácido linoleico;  $L^\bullet$ , radical alquilo (estruturas de ressonância);  $LOO^\bullet$ , radical peróxido;  $LOOH$ , hidroperóxido com ligações duplas conjugadas;  $In^\bullet$ , radical iniciador;  $InH$ , forma reduzida do radical iniciador).

A oxidação lipídica das LDL é acompanhada por variadas modificações estruturais e químicas que se reflectem na variação de vários parâmetros físico-químicos (Figura 32). Numa primeira fase os antioxidantes endógenos das LDL (essencialmente o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno) captam os radicais peróxido lipídicos e impedem a propagação oxidativa, ocorrendo peroxidação lipídica

numa pequena extensão, com a formação de uma quantidade mínima de dienos conjugados, hidroperóxidos e espécies reactivas (aldeídos) com o ácido tiobarbitúrico (TBARS, “tiobarbituric acid reactive species”). Quando os antioxidantes endógenos se esgotam inicia-se a fase 2, na qual os radicais peróxido atacam extensivamente e ocorre a propagação da peroxidação. Durante esta fase verifica-se a formação acentuada de hidroperóxidos, de dienos conjugados e o aumento do nível de aldeídos (espécies reactivas TBARS). Simultaneamente verifica-se um aumento da fluorescência a 430 nm como resultado da fragmentação da apoproteína B (Esterbauer *et al.*, 1991). A terceira fase é marcada essencialmente pela diminuição de hidroperóxidos que se transformam em aldeídos (MDA, 4-HNE).

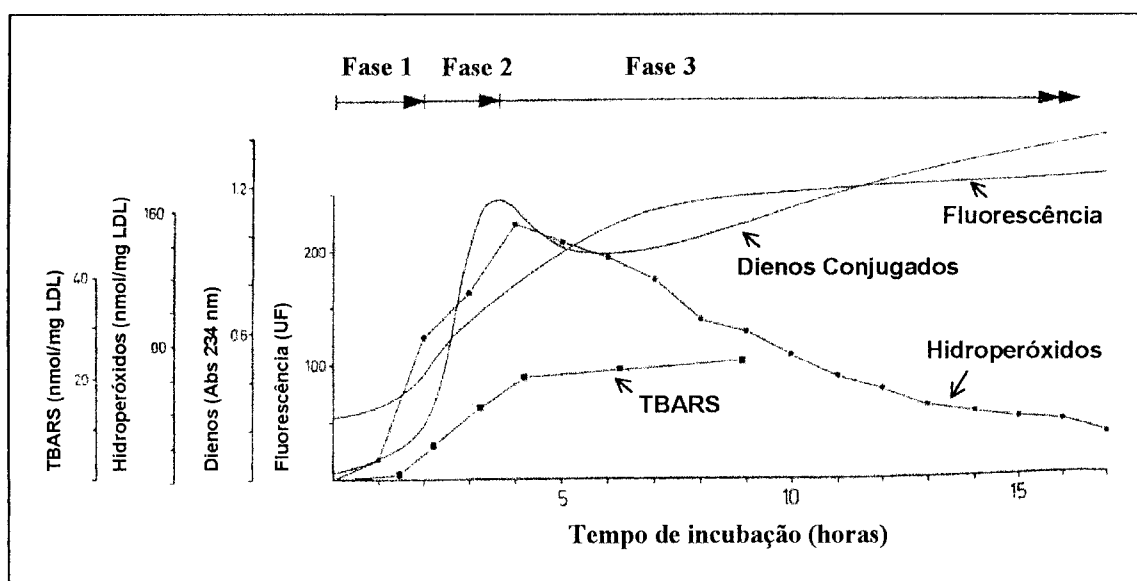


Figura 32- Cinética da oxidação das LDL e evolução da sua composição em termos das espécies reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos, dienos conjugados (Abs 234 nm) e fluorescência a 430 nm.

### 1.2.3- Mecanismos biológicos de prevenção da oxidação das LDL

O organismo possui mecanismos de defesa antioxidante que têm por objectivo impedir ou retardar a oxidação das biomoléculas, actuando ao nível da neutralização de potenciais agressores como radicais livres, radiação UV, raios X, poluição, etc. Dessas defesas fazem parte sistemas enzimáticos como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase e antioxidantes biologicamente activos como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), os carotenóides e os compostos polifenólicos. Pensa-se que os compostos polifenólicos, e

nomeadamente os flavonóides, devido ao seu carácter hidrofílico (grupos fenoxilo), possam actuar ao nível da interface meio aquoso/LDL prevenindo a oxidação das LDL (Laranjinha *et al.*, 1992, 1994; Laranjinha e Cadenas, 1999; Serafini *et al.*, 2000) através da sua capacidade de complexar iões metálicos (Frankel *et al.*, 1993, 1995; Teissedre *et al.*, 1995; Carbonneau *et al.*, 1997, 1999; Ivanov *et al.*, 2001) e de neutralizar radicais livres (Ivanov *et al.*, 2001) (Figura 33).

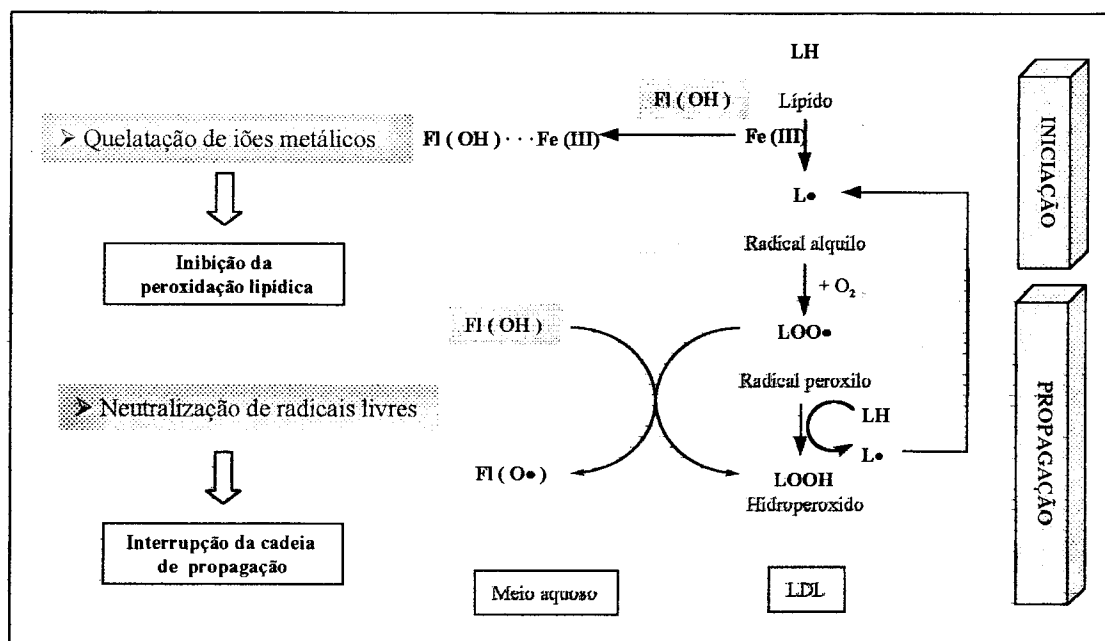


Figura 33- Mecanismos de inibição da peroxidação lipídica das LDL por acção dos flavonóides (FI(OH)); FI(O•), formas reduzida e oxidada do flavonóide; LH, ácido gordo insaturado constituinte das LDL; L•, radical alquilo; LOO•, radical peroxilo; LOOH, hidroperóxido).

Em 1984, Niki e seus colaboradores descobriram evidências da redução do radical tocoferilo (forma oxidada da vitamina E) pela vitamina C em inúmeros sistemas teste, verificando-se que quando presentes simultaneamente em solução ocorria primeiro o desaparecimento da vitamina C e só depois do esgotamento deste ocorria o desaparecimento da vitamina E. Estes resultados sugerem que os radicais presentes reagem preferencialmente com a vitamina E e por sua vez a forma oxidada desta reage com a vitamina C de modo a regenerar a vitamina E.

Os estudos de ressonância paramagnética electrónica (RPE) efectuados por Laranjinha e colaboradores (1999), envolvendo LDL como substrato de oxidação e a vitamina E, a vitamina C e o ácido cafeico (ácido fenólico) como antioxidantes vieram, em parte, comprovar estes

resultados. De facto, o primeiro sinal a ser detectado por RPE foi o do radical cromanoxilo (derivado da vitamina E), seguidamente o do radical do ácido cafeico e por fim o do radical ascorbato. Estes estudos permitiram ainda concluir que o ácido cafeico se pode encontrar localizado na interface entre o meio aquoso e as LDL (fase lipídica), sendo capaz de actuar sinergeticamente com as vitaminas C e E, com regeneração desta última (Figura 34). Estes polifenóis são assim capazes de promover a transferência do carácter radicalar da fase lipídica para o meio aquoso circundante, acompanhada por um decréscimo do potencial normal de redução das espécies radicalares formadas e diminuição dos riscos de oxidação das LDL no organismo.

Embora estes estudos realizados com o ácido cafeico não tenham sido alargados a outros antioxidantes, poder-se-á esperar que outras espécies polifenólicas apresentem um comportamento similar em virtude da semelhança estrutural, nomeadamente pela presença de grupos hidrofílicos (hidroxilo) e dos anéis hidrofóbicos (benzénicos), e dos valores do potencial normal de redução. Um estudo realizado por Jovanovic (1994) atribui à (+)-catequina um potencial normal de redução de 0.57 V, o que permite inferir uma analogia comportamental em termos redox com o ácido cafeico.

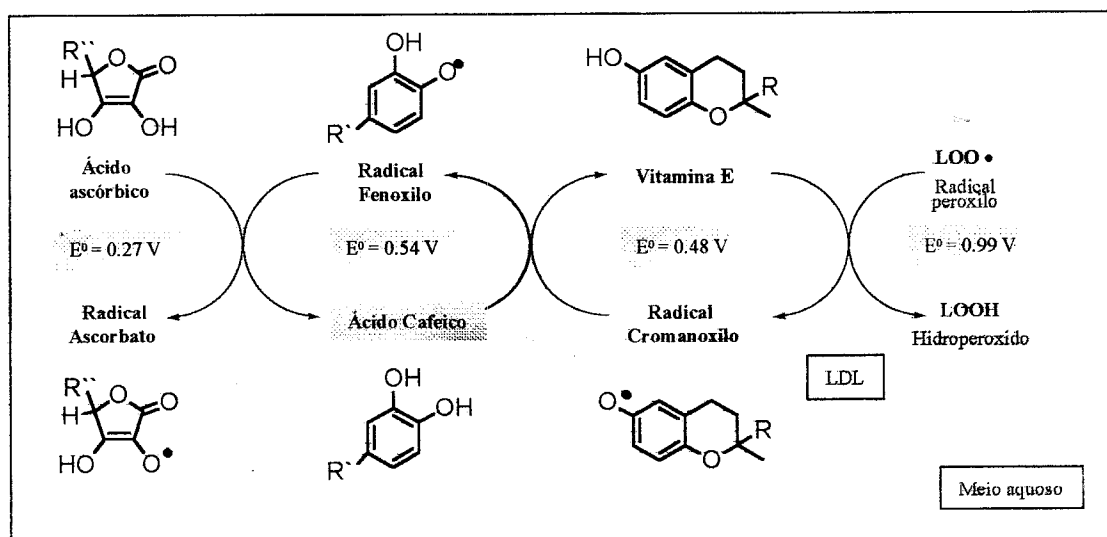


Figura 34- Acção antioxidante sinérgica entre o ácido cafeico e as vitaminas E e C na peroxidação lipídica das LDL ( $E^0$ , potencial normal de redução) (R,  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{CH}_2)_3\text{H}$ ; R',  $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$ ; R'',  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$  (adaptado de Laranjinha e Cadenas, 1999).

### 1.3- Métodos de análise da actividade antioxidante dos polifenóis

Existem muitas metodologias que podem ser usadas no estudo *in vitro* da actividade antioxidante de compostos polifenólicos, dada a diversidade de *agentes oxidantes*: AAPH (Burton *et al.*, 1981; Niki *et al.*, 1985; Pryor *et al.*, 1993), Cu(II) (Carbonneau *et al.*, 1997, Ivanov *et al.*, 2001), anião superóxido (Magnani *et al.*, 2000), AIBN, AMVN (Niki *et al.*, 1984, 1985); de *substratos de oxidação*: LDL (Laranjinha *et al.*, 1992, 1994; Carbonneau *et al.*, 1997; Serafini *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2001), ácido linoleico (Niki *et al.*, 1984, 1985; Pryor *et al.*, 1993); de *técnicas de análise*: monitorização do consumo de oxigénio (Burton *et al.*, 1981; Niki *et al.*, 1984, 1985), medição espectrofotométrica dos dienos conjugados (Niki *et al.*, 1985; Pryor *et al.*, 1993), determinação dos produtos secundários de oxidação por reacção com o ácido tiobarbitúrico (Niki *et al.*, 1985), método do tiocianato (Mitsuda *et al.*, 1981) por quimioluminescência (Niki *et al.*, 1985), por medição espectrofotométrica de radicais estáveis formados durante a oxidação tais como o DPPH (Blois, 1958), ABTS (Miller *et al.*, 1993) e DMPD (Ariga *et al.*, 1990).

Cada uma destas metodologias está circunscrita a um modelo experimental e permite obter informações bastante importantes e conclusivas mas apenas a nível comparativo. Isto é, apenas sob condições experimentais idênticas é válido comparar e hierarquizar a eficiência antioxidante de diversos compostos.

A oxidação controlada das LDL constitui um modelo válido para o estudo da actividade antioxidante de compostos, nomeadamente das procianidinas. O conceito “controlada” refere-se à ocorrência da oxidação a uma velocidade constante e conhecida de modo a permitir um estudo cinético da mesma. Esta condição pode ser conseguida pela utilização de AAPH (“2,2’-azobis (2-amidinopropane hydrochloride)”) como fonte de radicais iniciadores da oxidação em alternativa a outros iniciadores como Cu(II), lipoxigenase, peroxidases, peroxinitrito e mioglobina (Barclay *et al.*, 1980), utilizados frequentemente neste tipo de estudos. O AAPH é um composto azotado que sofre termólise a 37°C e origina radicais alquilo, os quais após reacção com o oxigénio dão origem a radicais peróxido (Figura 35).

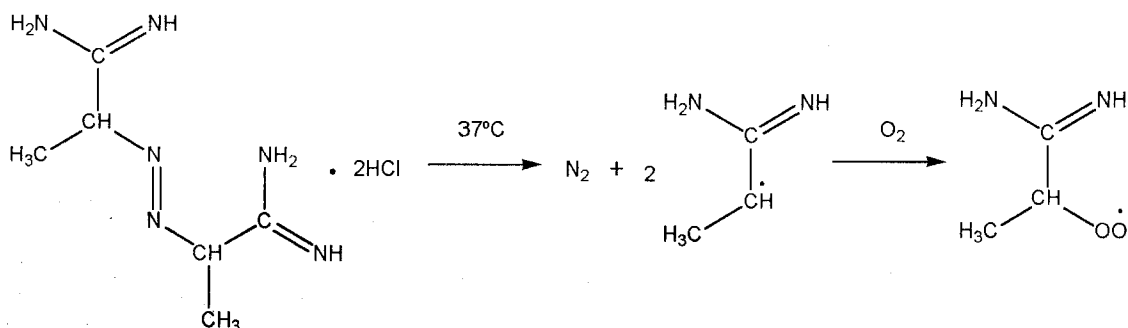


Figura 35- Termólise do AAPH.

Os radicais peróxido provenientes da decomposição térmica do AAPH difundem-se com facilidade no meio aquoso onde são gerados e atingem rapidamente as LDL onde atacam preferencialmente átomos de hidrogénio bis alílicos da cadeia carbonada de ácidos gordos insaturados (LH), iniciando a peroxidação.

Neste trabalho avaliou-se a actividade antioxidante de catequinas e procianidinas face à oxidação das LDL iniciada pelo AAPH recorrendo a três métodos distintos que foram seleccionados pela sua especificidade e sensibilidade: i) método fluorimétrico utilizando o ácido *cis*-parinárico; ii) medição dos dienos conjugados; iii) medição do consumo de oxigénio.

### 1.3.1- Modelo fluorimétrico utilizando o ácido *cis*-parinárico (*cis*-PnA)

O ácido *cis*-parinárico (ácido 9(Z), 11(E), 13(E), 15(Z)-octadecatetranoico) é um composto polinsaturado, cuja forma nativa (não oxidada) emite fluorescência, quando irradiada com um determinado tipo de radiação (Figura 36).

Esta molécula pelo facto de possuir várias ligações duplas apresenta-se como um substrato preferencial de oxidação, e a sua cadeia hidrofóbica permite a sua inclusão em sistemas membranares, e nomeadamente nas LDL, funcionando assim como uma sonda indicadora do estado de oxidação destas lipoproteínas.

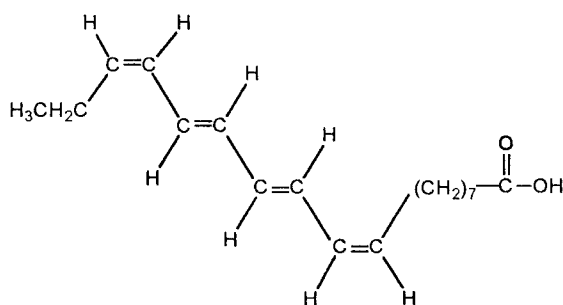


Figura 36- Estrutura do ácido *cis*-parinário (*cis*-PnA).

Quando as lipoproteínas e o *cis*-PnA nelas incorporado são submetidos a condições de oxidação, pela presença por exemplo de radicais provenientes da termólise do AAPH, a sonda é facilmente oxidada antes de se iniciar o processo de oxidação dos lípidos constituintes das LDL. Na presença de um antioxidante, verifica-se um período de inibição da oxidação da sonda, e consequentemente dos ácidos gordos intrínsecos às LDL, definido como período de indução (lag phase) ( $t_i$ ) que depende da concentração e do tipo de antioxidante presente. Após este período de indução, inicia-se a oxidação do ácido *cis*-parinário que se traduz por uma diminuição da intensidade de fluorescência.

### 1.3.2- Medição dos dienos conjugados

Os ácidos gordos constituintes das LDL quando sofrem oxidação originam hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas que possuem absorvância característica a 242 ou 234 nm, dependendo da isomeria apresentada (*cis:trans* ou *trans:trans*, respectivamente) como foi referido anteriormente (Figuras 30 e 31). Na presença de um antioxidante a oxidação dos ácidos gordos, e consequentemente a formação de dienos conjugados são inibidas por um determinado período de tempo ( $t_i$ , período de indução) que se caracteriza por um sinal da absorvância baixo aos comprimentos de onda referidos anteriormente.

Apesar de moroso, este método constitui um índice real do estado de oxidação dos ácidos gordos das LDL já que mede directamente a formação dos produtos dessa transformação durante a fase de propagação, contrariamente ao método do ácido *cis*-parinário.

### 1.3.3- Medição do consumo de oxigénio

O oxigénio intervém directamente na etapa de propagação da peroxidação lipídica (Figura 30 e 31). A formação dos radicais peroxilo lipídicos durante essa etapa da oxidação dos ácidos gordos das LDL é acompanhada por um intenso consumo de oxigénio, o qual é inibido ou diminuído pela presença de um antioxidante. Este agente inibidor interrompe ou retarda a oxidação, e conseqüentemente o consumo de oxigénio, por um determinado período de tempo ( $t_i$ , período de indução), no fim do qual é retomado o normal consumo de oxigénio.

A monitorização do consumo de oxigénio durante uma reacção de oxidação pode ser conseguida através de um eléctrodo de oxigénio tipo Clark.

## 2- Material e Métodos

### 2.1- Isolamento das LDL

As lipoproteínas de baixa densidade humanas foram isoladas do plasma de um voluntário por um processo de ultracentrifugação (65000 rpm, 3 h, 15°C) no qual foi possível obter um gradiente de densidade de lipoproteínas e separar a fracção das LDL segundo o método descrito na literatura (Vieira *et al.*, 1996).

Uma amostra de sangue fresco (50 mL) foi distribuído por tubos de centrifuga de 10 mL contendo heparina. O sangue foi centrifugado a 3000 g, à temperatura de 15°C durante 15 min. O plasma (23 mL) foi separado do “pellet” (células sanguíneas) e a este foram adicionados 460 µL de uma solução aquosa de EDTA (50 mM). A densidade do plasma foi ajustada a 1.21 g/mL com KBr (aproximadamente 7.5 g) por medição num densitómetro.

Seguidamente o plasma foi novamente centrifugado numa ultracentrifuga de modo a formar-se um gradiente descontínuo de densidade das lipoproteínas. Em tubos de centrifuga de policarbonato foram colocados 2.8 mL de plasma e 6.6 mL de tampão fosfato (20 mM fosfato, 110 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4). A adição de tampão fosfato sob o plasma foi realizada muito lentamente (gota a gota) por forma a não perturbar o equilíbrio entre as fases. Os tubos foram cuidadosamente colocados no rotor (70.1 Ti) da ultracentrifuga e procedeu-se à centrifugação a 65000 rpm, à temperatura de 15°C durante 3 h, com aceleração e desaceleração lentas. Em seguida foram separadas 3 fracções de lipoproteínas de diferentes densidades: a camada superior correspondente às quilomicrons, a camada intermédia correspondente às LDL e a camada inferior correspondente às HDL (ver Tabela 8).

A fracção de cada tubo correspondente à densidade das LDL foi cuidadosamente retirada com uma pipeta de pasteur e as várias fracções misturadas (13.7 mL). Esta suspensão de LDL foi submetida a uma etapa de concentração e purificação simultâneas através de um processo de diálise (2 h, 4°C, no escuro, sob atmosfera de azoto) contra uma solução de tampão fosfato (110 mM NaCl, 20 mM fosfato, pH 7.4). A suspensão concentrada foi filtrada através de um filtro de porosidade 0.22 µm colocado numa seringa. Foi medido o volume da suspensão de LDL filtrada (4.5 mL), retirada uma alíquota para doseamento do conteúdo proteico das LDL e à restante

porção foram adicionados 2.25 mL de sacarose a 30% por forma a impedir a agregação das lipoproteínas. A suspensão de LDL foi conservada em atmosfera de argon a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Todas as soluções e procedimentos de lavagem foram realizados com água Milli Q ultra-pura por forma a impedir a contaminação da suspensão de LDL com metais ou outros agentes de oxidação.

## 2.2- Determinação do conteúdo proteico das LDL isoladas

O conteúdo proteico das LDL isoladas foi determinado espectrofotometricamente pelo método de Lowry, utilizando albumina sérica bovina (ASB) como padrão (Lowry *et al.*, 1951). Para o efeito foram preparados vários tubos com diferentes concentrações da proteína padrão (ASB) e de LDL como está descrito na Tabela 9.

Dez minutos após a adição do reagente A adicionou-se o reagente B. Os tubos permaneceram a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 min e leu-se a absorvância a 750 nm. A partir da recta de calibração estabelecida através das soluções padrão de ASB determinou-se o conteúdo proteico das LDL de 2.155 g/L.

Tabela 9- Reagentes e quantidades utilizados na determinação do conteúdo proteico das LDL pelo método de Lowry. ASB, albumina sérica bovina; reagente A: 150 mL ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em  $\text{NaOH}$  0.1 M) + 3 mL ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5% em solução aquosa de citrato de sódio 1%); reagente B: solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteau (50%).

	Branco	Padrão(ASB)				Amostra (LDL)			
		P1	P2	P3	P4	A1	A2	A3	A4
ASB / $\mu\text{L}$ (1mg/mL)	-	25	50	100	150	-	-	-	-
LDL / $\mu\text{L}$	-	-	-	-	-	20	20	30	40
$\text{H}_2\text{O}$ / $\mu\text{L}$	1000	975	950	900	850	980	980	970	960
SDS / $\mu\text{L}$ (20%)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Reagente A / mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Reagente B / mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

### 2.3- Determinação da actividade antioxidante das catequinas e procianidinas oligoméricas

A (-)-epicatequina-3-O-galato, o B2-3''-O-galato, os dímeros B1-B8, os trímeros C1 e T1 não existem no comércio e por isso tiveram de ser obtidos no laboratório por extração a partir de grainhas de uva e por síntese (Parte 1). A (+)-catequina e a (-)-epicatequina, apesar de existirem no comércio, foram também obtidas no laboratório.

#### 2.3.1- Monitorização da fluorescência do ácido *cis*-parinárico

Os ensaios foram realizados num espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50, com agitação magnética e a célula de leitura termostatizada a 37°C. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram respectivamente 324 e 413 nm (slit: 3.5 nm) (Kuypers *et al.*, 1987).

Foram realizados vários ensaios preliminares por forma a determinar as concentrações de LDL, de ácido *cis*-parinárico (*cis*-PnA) e de AAPH adequados para este estudo. Relativamente às LDL, optou-se por uma concentração de 45 µg/2 mL já que nestas condições foram obtidos valores de fluorescência suficientemente elevados (incorporação completa de sonda nas LDL) e sem gasto desnecessário de lipoproteínas. Escolheu-se uma concentração de 1.5 µM para o *cis*-PnA visto não saturar o sistema e o sinal de fluorescência ser proporcional à sua concentração. Quanto ao AAPH optou-se por uma concentração de 15 mM de modo a proporcionar um ensaio com uma duração adequada.

Após termostatização de 2.00 mL de uma solução de tampão fosfato (110 mM NaCl, 20 mM fosfato, pH 7.4) na cuvete de quartzo (10 x 10 mm) foram adicionados os restantes compostos pela seguinte ordem:

- Tempo 0'- 20.0 µL da suspensão de LDL (2.155 mg/mL), equivalente a 45 µg de conteúdo proteico;
- Tempo 1'- 3.0 µL da solução etanólica de *cis*-PnA (1 mM) de modo a obter-se um concentração final de 1.5 µM. Em seguida procedeu-se à incorporação da sonda nas membranas por agitação suave durante 1 min;
- Tempo 2'- solução aquosa de antioxidante (catequinas e procianidinas) (para três valores de concentração diferentes). Esta etapa está ausente no ensaio controlo;
- Tempo 3'- 20.0 µL da solução de AAPH (500 mM) numa concentração final de 15 mM.

A evolução da fluorescência foi monitorizada durante 30 min (Figura 37).

O ensaio controlo, sem adição de catequinas ou procianidinas, permitiu avaliar a acção dos antioxidantes endógenos das LDL.

A capacidade antioxidante das catequinas e das procianidinas foi quantificada pelo período de indução ( $t_i$ ) característico de cada composto (Figura 37). O  $t_i$  corresponde ao período de tempo durante o qual o antioxidante é capaz de inibir a oxidação das LDL. Este parâmetro foi determinado graficamente como o intervalo de tempo entre as intersecções das tangentes às curvas de inibição (rectas  $a_1$  e  $a_2$ ) e de propagação (rectas  $b_1$  e  $b_2$ ) da oxidação nos ensaios amostra e controlo. Este parâmetro foi expresso em função da concentração de composto testada ( $t_i = f([AH]))$  e o respectivo declive corresponde ao período de indução molar ( $T_i$ ) (Tabela 10). Em caso de inexistência de  $t_i$ , a actividade antioxidante das procianidinas foi avaliada pela velocidade de oxidação ( $k_{ox}$ ). Este parâmetro corresponde ao declive da curva de oxidação de cada ensaio, e quando expresso em função da concentração da procianidina testada permitiu determinar a velocidade de oxidação molar ( $K_{ox}$ ) (Tabela 10).

Todas as soluções e procedimentos de lavagem foram realizados com água Milli Q ultra-pura por forma a impedir a contaminação da suspensão de LDL com metais ou outros agentes de oxidação.

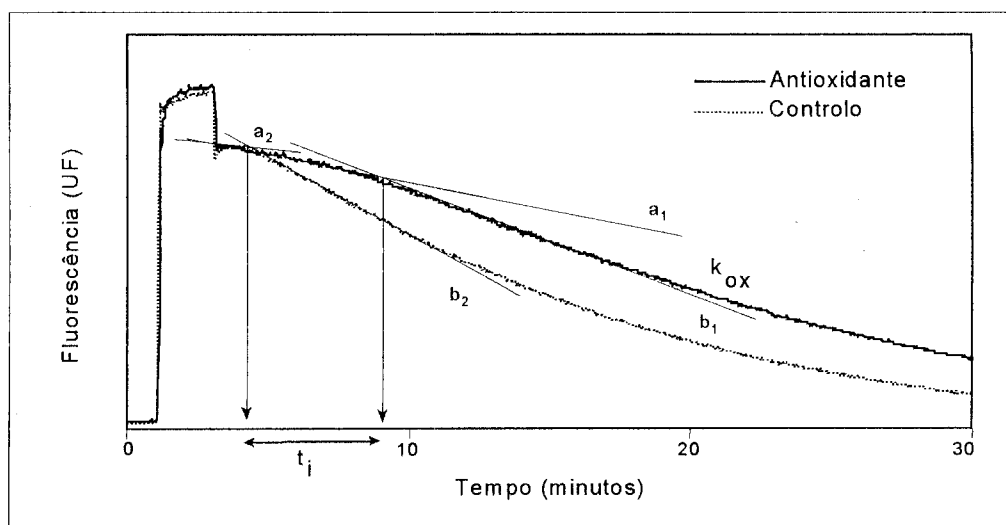


Figura 37- Evolução da fluorescência do ácido *cis*-parinárico incorporado nas LDL submetidas a oxidação induzida pelo AAPH em presença e na ausência de antioxidante (ensaio controlo) ( $a_1$  e  $a_2$ , tangentes às curvas de inibição nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente;  $b_1$  e  $b_2$ , tangentes às curvas de propagação da oxidação nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente;  $t_i$ , período de indução;  $k_{ox}$ , velocidade de oxidação).

### 2.3.2- Monitorização da formação dos dienos conjugados

A monitorização da formação dos dienos conjugados foi realizada a 37°C num espectrofotómetro Shimadzu UV-265 de feixe duplo ao comprimento de onda de 234 nm (Esterbauer *et al.*, 1989).

Realizaram-se ensaios prévios para determinar a concentração de AAPH e LDL adequados para este estudo. Optou-se por uma concentração mínima de AAPH (5 mM) visto que este absorve ao comprimento de onda utilizado para avaliar os dienos conjugados (234 nm), sendo por isso necessário efectuar uma correcção do sinal. Uma concentração elevada de AAPH provocaria uma grande interferência no sinal durante a execução dos ensaios. Quanto às LDL, optou-se por uma concentração de 30 µg/2 mL.

Foi preparada uma solução de AAPH (5 mM, 12 mL) em tampão fosfato (110 mM NaCl, 20 mM fosfato, pH 7.4). Colocaram-se 2.00 mL desta solução de AAPH em duas cuvets de quartzo (10 x 10 mm) (cuvets de referência e da amostra) e procedeu-se à correcção do sinal de absorvância. Em seguida foram rapidamente adicionados 30.0 µL de uma solução do composto fenólico (concentração final de 1.5 µM) e 14.0 µL da suspensão de LDL (2.155 g/L), correspondente a 30 µg de conteúdo proteico. Procedeu-se a uma cuidadosa homogeneização da mistura por forma a não desnaturar as LDL. A cada valor de absorvância registado a 234 nm na cuvete amostra foi automaticamente subtraído o valor de absorvância relativo ao AAPH e seus derivados (cuvete referência). Durante os ensaios as cuvets forma mantidas ao abrigo da luz, a 37°C e tapadas de modo a evitar a evaporação da solução. Registou-se a evolução da formação dos dienos conjugados durante todo o processo de oxidação por um período médio de 5 h para cada ensaio (Figura 38). Todos os ensaios foram efectuados em triplicado. Para além das várias procianidinas isoladas na Parte 1 foram também testados alguns compostos antioxidantes utilizados frequentemente como referência em estudos de oxidação como o ácido ascórbico, o trolox e o ácido cafeico (concentração final de 1.5 µM).

Analogamente aos ensaios do *cis*-PnA, a actividade antioxidante dos compostos foi determinada a partir dos diferentes períodos de indução ( $t_i$ ) dos ensaios na presença e na ausência (controlo) de antioxidante (Figura 38 e Tabela 11).

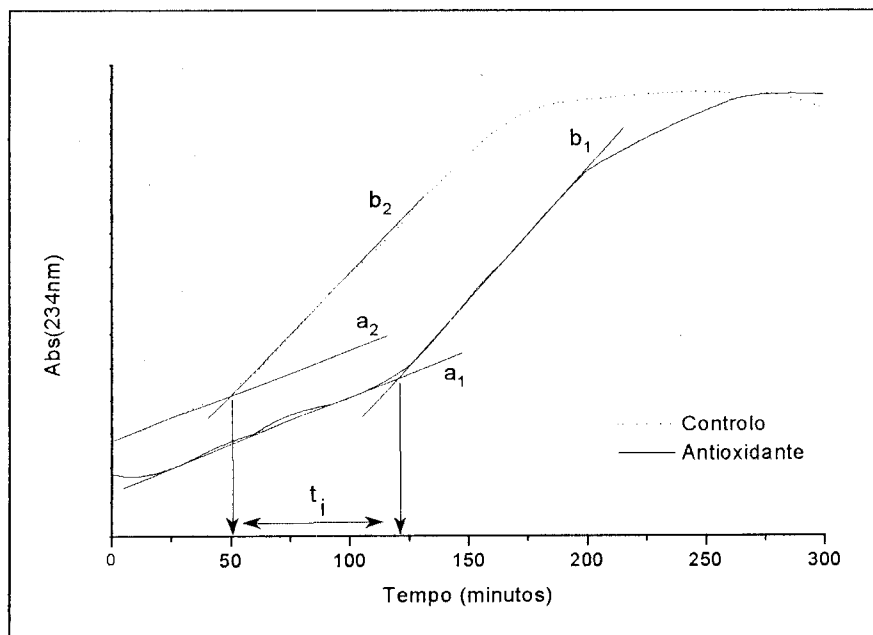


Figura 38—Formação dos dienos conjugados na presença e ausência de antioxidante (controlo) ( $a_1$  e  $a_2$ , tangentes às curvas de inibição da oxidação nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente;  $b_1$  e  $b_2$ , tangentes às curvas de propagação da oxidação nos ensaios com e sem antioxidante, respectivamente;  $t_i$ , período de indução).

### 2.3.3- Monitorização do consumo de oxigénio

Os ensaios foram realizados num eléctrodo de oxigénio tipo Clark (Hansatech<sup>®</sup>) em célula fechada e ao abrigo da luz, à temperatura de 37°C e sob agitação, segundo o método descrito na literatura (Laranjinha *et al.*, 1992).

À semelhança dos métodos anteriores, foram realizados estudos preliminares por forma a otimizar as condições experimentais, nomeadamente a concentração de LDL, de AAPH e de antioxidante.

Colocou-se na célula do eléctrodo 1,00 mL de uma solução tampão fosfato (110 mM NaCl, 20 mM fosfato, pH 7.4), à qual se adicionaram 16.5  $\mu$ L de suspensão de LDL (2.155 g/L), correspondente a 36  $\mu$ g de conteúdo proteico. A reacção de oxidação foi iniciada por adição 20,0  $\mu$ L de uma solução de AAPH (500 mM), obtendo-se uma concentração final de 10 mM. Durante a fase de propagação radicalar adicionaram-se 30,0  $\mu$ L de uma solução concentrada de catequinas ou procianidinas (100  $\mu$ M) de modo a obter uma concentração final de 1.5  $\mu$ M (Figura 39). Para

além das catequinas e procianidinas, foram ainda testados o ácido cafeico, o ácido ascórbico e o trolox, numa concentração final de 1.5  $\mu\text{M}$ . O antioxidante foi adicionado durante a fase de propagação com o objectivo de avaliar se os compostos fenólicos eram capazes de interromper a cadeia radicalar. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A capacidade antioxidante das catequinas e procianidinas oligoméricas foi avaliada pelo período de indução determinado graficamente como o intervalo de tempo entre o momento de adição do antioxidante e a intersecção das tangentes às curvas de inibição (a) e propagação (b) do ensaio (Figura 39 e Tabela 11).

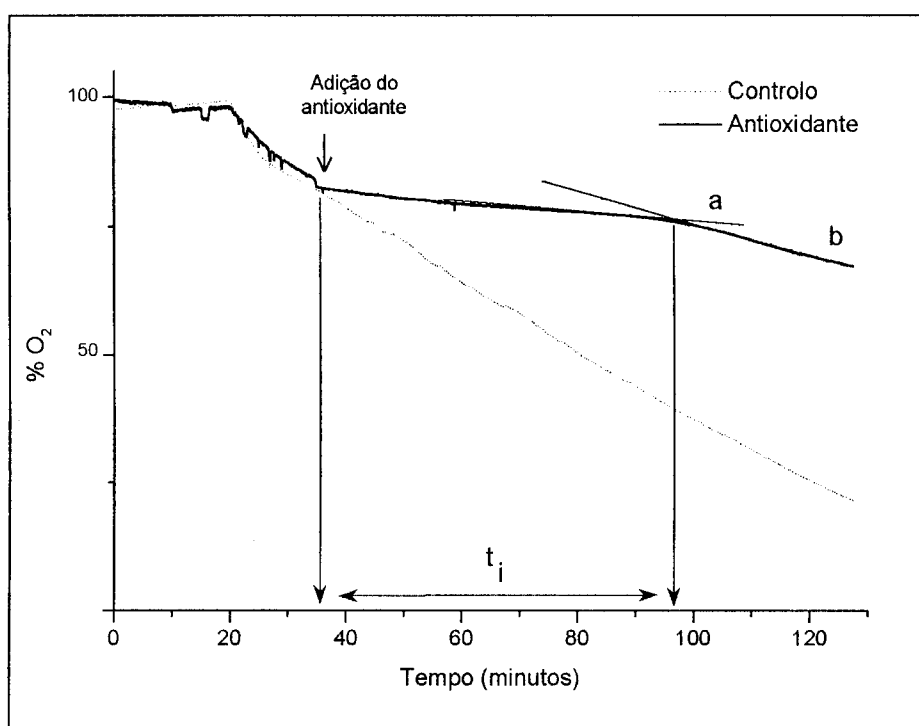


Figura 39— Monitorização do consumo de oxigénio na presença e na ausência de antioxidante (a, tangente à curva de inibição da oxidação no ensaio com antioxidante; b, tangente à curva de propagação da oxidação no ensaio com antioxidante; t<sub>i</sub>, período de indução).

### 3- Resultados e Discussão

A eficiência antioxidante das catequinas ((+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-O-galato) e das procianidinas oligoméricas (dímeros B1-B8, dímero B2-3''-O-galato, trímeros C1 e T1) face oxidação das LDL humanas foi avaliada por diferentes metodologias: I- no *estado inicial* pela medição da **fluorescência de uma sonda (ácido *cis*-parinárico)** altamente sensível à oxidação e previamente incorporada nas partículas lipoproteicas; II- num *estado intermédio* pela medição do **consumo de oxigénio**; III- num *estado mais avançado* de oxidação pela medição da **absorvância (234 nm) dos dienos conjugados**, produtos da peroxidação lipídica (Laranjinha *et al.*, 1992, 1994; Serafini *et al.*, 2000).

#### 3.1- Oxidação do ácido *cis*-parinárico (método fluorimétrico)

A capacidade neutralizadora das catequinas e das procianidinas face aos radicais peróxilo hidrofílicos foi avaliada em termos do período de indução molar ( $T_i$ ). De um modo geral verificou-se que o tipo de estrutura e nomeadamente a estereoquímica destes compostos (isómeros) influencia o período de indução molar (Tabela 10). As procianidinas diméricas B1-B3 revelaram um comportamento antioxidante diferente das restantes procianidinas e catequinas na medida em que não proporcionaram qualquer período de indução, mas simplesmente desaceleraram a reacção de oxidação. O dímero B4 produziu um período de inibição embora de curta duração. Dada a ausência de período de indução nos dímeros C4-C8 (B1-B4), a quantificação da sua actividade antioxidante foi efectuada pela determinação da velocidade de oxidação molar ( $K_{ox}$ ). Os dímeros B1 e B2 apresentaram um valor de  $K_{ox}$  semelhante, e inferior ao dos restantes dímeros C4-C8.

No entanto, nos outros dois métodos utilizados neste estudo, dienos conjugados e consumo de oxigénio, os dímeros C4-C8 induziram um período de inibição relativamente elevado comparativamente aos restantes compostos.

O dímero B2-3''-O-galato apresentou a actividade antioxidante mais elevada ( $T_i=5.52$ ), logo seguido do trímero C1, das catequinas e da epicatequina-3-O-galato. Os dímeros C4-C6 (B5-B8) proporcionaram um efeito inibitório intermédio e os dímeros C4-C8 (B1-B4), que não induziram qualquer período de inibição, revelaram-se os antioxidantes menos eficazes neste método.

É de salientar que, para a gama de concentração testadas, se verificou uma dependência linear do período de indução com a concentração de catequinas e procianidinas.

Tabela 10– Actividade antioxidante das catequinas e procianidinas oligoméricas face à oxidação do *cis*-PnA incorporado nas LDL ( $t_i$ , período de indução;  $T_i$ , período de indução molar;  $k_{ox}$ , velocidade de oxidação;  $K_{ox}$ , velocidade de oxidação molar).

3-flavanóis	Concentração $\mu\text{M}$	<i>cis</i> -PnA			
		$t_i$ s	$T_i$ $10^{-8} \times \text{M}^{-1} \text{s}$	$k_{ox}$ $\text{s}^{-1}$	$K_{ox}$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
Catequinas	(+) -catequina	0.5	-	-	-
		1.5	602	1.77	-
		3.0	868	-	-
	(-) -epicatequina	0.5	-	-	-
		1.5	800	1.33	-
		3.0	1000	-	-
Dímeros C4-C8	B1 (epi-cat)	1.5	0	0.0501	0.0057
		3.0	0	0.0358	
		5.0	0	0.0297	
	B2 (epi-epi)	1.5	0	0.0417	0.0059
		3.0	0	0.0328	
		5.0	0	-	
	B3 (cat-cat)	1.5	0	0.0476	0.0071
		3.0	0	0.0291	
		5.0	0	0.0220	
	B4 (cat-epi)	1.5	400	0.0471	0.0063
		3.0	423	0.54	
		5.0	582	0.0243	
Dímeros C4-C6	B5 (epi-epi)	1.5	-	-	-
		3.0	259	0.71	
		5.0	400	-	
	B6 (cat-cat)	5.0	-	-	-
		10.0	431	0.007	
		50.0	459	-	
	B7 (epi-cat)	1.5	-	-	-
		3.0	356	1.29	
		10.0	1259	-	
	B8 (cat-epi)	1.5	500	-	-
		3.0	706	1.26	
		5.0	944	-	
Trímeros	T1 (epi-epi-cat)	1.5	-	-	-
		5.0	842	0.01	
		10.0	1010	-	
	C1(epi-epi-epi)	1.5	559	-	-
		3.0	912	2.35	
		5.0	-	-	
Ésteres-galato	B2-3''-O-galato	0.5	447	-	-
		1.5	1000	5.52	
		3.0	-	-	
	(-)-epicatequina-3-O-galato	1.5	459	-	-
		3.0	747	1.70	
		5.0	1058	-	

### 3.2- Medição dos dienos conjugados e do consumo de oxigénio

Na Tabela 11, para além do período de indução ( $t_i$ ) estão também indicados os valores dos períodos de indução expressos relativamente ao trolox, análogo hidrossolúvel da vitamina E ( $t_i(\text{plasma})/t_i(\text{trolox})$ ).

Nos ensaios da monitorização dos dienos conjugados formados, e sob as condições experimentais descritas, o éster B2-3''-O-galato revelou-se o antioxidante mais eficiente (6.10), logo seguido do trímero C1 (3.47), dos dímeros C4-C8 (B1-B4) (valor médio 2.66), dos monómeros (valor médio 2.21) e da (-)-epicatequina-3-O-galato (1.91); os dímeros C4-C6 (B5-B8), revelaram-se os inibidores menos eficazes (valor médio 1.19), com excepção do dímero B8 que apresentou uma actividade antioxidante significativamente superior.

Este método apesar de moroso constitui um índice real da oxidação dos ácidos gordos das LDL em oposição ao ácido *cis*-parinárico que funciona como uma sonda e que por conseguinte é um método indirecto de avaliação.

Nos ensaios da medição do consumo de oxigénio, as catequinas e procianidinas revelaram uma actividade antioxidante relativa semelhante à constatada nos ensaios espectrofotométricos, mas com períodos de indução menores. A única diferença foi que nestes ensaios as procianidinas diméricas B7 e B8 (tipo C4-C6) apresentaram uma capacidade antioxidante semelhante à dos dímeros C4-C8 (B1-B4).

Na generalidade, os resultados obtidos por estes dois métodos apresentam-se similares e permitem estabelecer uma ordem da eficiência antioxidante das catequinas e procianidinas similar à obtida nos ensaios fluorimétricos, com excepção dos dímeros C4-C8, e em especial os dímeros B1, B2 e B3 que induziram um período de inibição importante na formação dos dienos conjugados e consumo de oxigénio, contrariamente ao que se verificou na oxidação do ácido *cis*-parinárico, onde não apresentaram qualquer período de indução.

É de salientar que quase todos os compostos polifenólicos testados, com excepção do dímero B6 em ambos os métodos e do dímero B7 nos dienos conjugados, apresentaram um período de indução superior ao trolox e aos ácidos ascórbico e cafeico.

Tabela 11- Períodos de indução ( $t_i$ ) das catequinas, procianidinas e trolox, ácido ascórbico e ácido cafeico (1.5  $\mu$ M) face à oxidação das LDL (30  $\mu$ g/2mL) iniciada pelo AAPH (5 mM).

Composto	Dienos Conjugados		Consumo O <sub>2</sub>	
	$t_i$ / s	$t_i(\text{plasma})/t_i(\text{trolox})$	$t_i$ / s	$t_i(\text{plasma})/t_i(\text{trolox})$
Catequinas				
(+)-catequina	138.3 $\pm$ 5.2	2.21	27.4 $\pm$ 3.5	3.0
(-)-epicatequina	130.7 $\pm$ 7.3	2.08	26.5 $\pm$ 1.3	2.9
Procianidinas				
Dímeros C4-C8:				
B1 (epi-cat)	134.1 $\pm$ 18.7	2.14	54.6 $\pm$ 3.6	5.9
B2 (epi-epi)	159.7 $\pm$ 8.8	2.55	60.4 $\pm$ 0.4	6.6
B3 (cat-cat)	187.8 $\pm$ 8.1	2.99	98.7 $\pm$ 10.5	10.7
B4 (cat-epi)	172.3 $\pm$ 25.5	2.75	63.4 $\pm$ 8.1	6.9
Dímeros C4-C6:				
B5 (epi-epi)	84.9 $\pm$ 6.9	1.35	18.5 $\pm$ 2.6	2.0
B6 (cat-cat)	61.0 $\pm$ 4.6	0.97	0.0 $\pm$ 0.0	0.0
B7 (epi-cat)	70.6 $\pm$ 3.2	1.12	56.9 $\pm$ 2.8	6.2
B8 (cat-epi)	180.6 $\pm$ 31.4	2.88	63.8 $\pm$ 2.6	6.9
Trímeros:				
T1 (epi-epi-cat)	122.4 $\pm$ 8.8	1.95	43.7 $\pm$ 2.0	4.8
C1 (epi-epi-epi)	214.6 $\pm$ 10.6	3.47	127.7 $\pm$ 14.8	13.9
Ésteres-galato:				
B2-3''-O-galato	385.1 $\pm$ 25.2	6.10	239.6 $\pm$ 13.5	26.0
(-)-epicatequina-3-O-galato	118.0 $\pm$ 3.1	1.91	36.7 $\pm$ 7.7	4.0
Padrões				
Trolox	62.7 $\pm$ 1.2	1.00	9.2 $\pm$ 0.6	1.0
Ácido ascórbico	78.9 $\pm$ 11.0	1.26	3.4 $\pm$ 0.3	0.4
Ácido cafeico	98.9 $\pm$ 2.0	1.58	21.9 $\pm$ 1.1	2.4

#### 4- Conclusões

As catequinas e as procianidinas oligoméricas representam uma fracção significativa da componente polifenólica ingerida diariamente e revelaram, sob as condições experimentais descritas anteriormente, uma actividade antioxidante superior à de antioxidantes como o ácido ascórbico e o trolox. Apesar destes resultados atribuírem uma importante bioactividade a estes compostos fenólicos, estes factos não podem ser extrapolados para a situação *in vivo*.

O uso de três metodologias distintas na avaliação da capacidade antioxidante permitiu um estudo mais completo e conclusivo quanto ao modo de acção destes polifenóis face à peroxidação lipídica.

Nos ensaios fluorimétricos, as catequinas e as procianidinas oligoméricas actuaram ao nível da etapa de iniciação da oxidação das LDL, neutralizando os radicais peroxilo derivados do AAPH numa extensão que dependeu da sua eficiência antioxidante (Figura 30, reacção 7). Nestes ensaios os compostos fenólicos testados revelaram dois tipos de comportamento distintos face à oxidação das LDL: os dímeros C4-C6 (B5-B8), as catequinas, os trimeros C1 e T1 e os ésteres-galato induziram um período de inibição, no qual a oxidação foi quase totalmente suprimida, enquanto que os dímeros C4-C8 (B1-B3) não proporcionaram qualquer período de indução e apenas diminuíram a velocidade de oxidação, inibindo a oxidação numa extensão limitada.

Destes resultados conclui-se que:

i) os monómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina revelaram uma actividade antioxidante semelhante, sugerindo que a estereoquímica do anel pirânico C não influencia significativamente a eficiência antioxidante das unidades monoméricas;

ii) a actividade antioxidante das várias procianidinas diméricas contendo a ligação interflavonóide C4-C8 (B1-B4) é semelhante, sugerindo que a sua actividade não depende da natureza da unidade monomérica estrutural. Por outro lado, a protecção face à oxidação das LDL proporcionada pelas procianidinas diméricas C4-C8 é superior à exercida pelos dímeros C4-C6, particularmente quando comparada com os dímeros B5 e B6, sugerindo que a ligação interflavonóide é uma característica estrutural relevante na eficiência antioxidante dos compostos. O diferente comportamento dos dímeros C4-C6 quando comparada com a dos dímeros C4-C8 pode resultar das diferentes conformações que estes dois grupos de procianidinas adoptam em solução aquosa, isto é, estudos moleculares mostraram que os dímeros C4-C8 adoptam uma conformação mais fechada enquanto os dímeros C4-C6 apresentam uma estrutura mais alongada

(Fronczek *et al.*, 1985; Balas *et al.*, 1995; De Freitas, 1995, 1998) (Figura 40). Estudos sobre a lipofilia destas conformações parecem indicar que os dímeros C4-C8 possuem um carácter hidrofóbico ligeiramente superior ao dos dímeros C4-C6 (De Freitas, 1995). Neste caso os dímeros C4-C8 apresentam uma maior afinidade para com a superfície das LDL e assim interactivam mais eficazmente com os radicais peróxido de origem lipídica ( $\text{LOO}^\bullet$ ) do que os radicais peróxido presentes na fase aquosa ( $\text{ROO}^\bullet$ ), nomeadamente aqueles resultantes do AAPH, quando comparados com os dímeros C4-C6. Deste modo, os dímeros C4-C8 (B1-B4) pode exercer um efeito mais pronunciado sobre os radicais presentes no interior das LDL (fase de propagação avaliada pela formação dos dienos conjugados e consumo de oxigénio) e os dímeros C4-C6 (B5-B8) exercem uma acção inibitória mais eficaz face aos radicais iniciadores produzidos na fase aquosa a partir do AAPH, prevenindo a iniciação da cadeia peroxidativa das LDL (fluorescência do *cis*-PnA). Este facto pode explicar o diferente comportamento das duas séries de procianidinas diméricas nos ensaios com o ácido *cis*-parinárico relativamente à formação dos dienos conjugados e consumo de oxigénio.

iii) a capacidade antioxidante da (-)-epicatequina, do dímero B2 e do trímero C1 aumenta segundo esta ordem. Isto pode ser explicado pelo: a) aumento do número de grupos hidroxilo livres, potenciais dadores de átomos de hidrogénio, responsáveis por um aumento da eficiência antioxidante em solução aquosa; b) aumento do coeficiente de partição deste compostos para a fase lipídica com o aumento do grau de polimerização (Plumb *et al.*, 1998).

iv) a actividade antioxidante é aumentada pela esterificação do grupo hidroxilo na posição C3 com o ácido gálico, devido ao aumento do número de grupos hidroxilo livres. No entanto, a galoilação causa um aumento excepcional da actividade antioxidante no dímero B2-3''-O-galato em comparação com a (-)-epicatequina-3-O-galato. É importante referir que o dímero B2-3''-O-galato se revelou o antioxidante mais eficaz nos três métodos usados. Estudos moleculares anteriores relativos à determinação da conformação dos 3-flavanóis em solução por técnicas de ressonância magnética nuclear e modelação molecular, mostraram uma possível interacção " $\pi$ - $\pi$ " entre o anel aromático galato e o anel B do dímero B2-3''-O-galato, originando uma estrutura compacta (Figura 40). Nos compostos análogos, o dímero B2 e a (-)-epicatequina-galato, esta interacção não se verifica (De Freitas *et al.*, 1998). Este aumento extraordinário da actividade antioxidante do dímero B2 proporcionado pelo grupo galoílo pode ser explicado pela

estabilização do respectivo radical fenoxilo obtida pela deslocalização adicional do electrão desemparelhado entre as orbitais  $\pi$  do grupo galoilo e do anel catecol B.

O mecanismo descrito na literatura para explicar o potencial efeito antioxidante do ácido cafeico face à oxidação das LDL (Figura 34) pode ser também proposto para as catequinas e procianidinas (Laranjinha e Cadenas, 1999), isto é, os 3-flavanóis devido à sua natureza hidrofílica podem interagir com a monocamada fosfolipídica das LDL. À superfície das LDL, as catequinas e as procianidinas podem actuar a três níveis: i) neutralização de radicais peroxilo e formação de radicais fenoxilo relativamente estáveis, com conseqüente interrupção da cadeia de propagação lipídica; ii) regeneração de antioxidantes endógenos como a vitamina E, a qual constitui a primeira linha de defesa face aos danos oxidativos (efeito sinérgico); iii) quelatação de iões de metais de transição catalíticos como Fe(III), Cu(II) e Al(III) presentes no interior das LDL e no plasma, inibindo a iniciação da peroxidação lipídica.

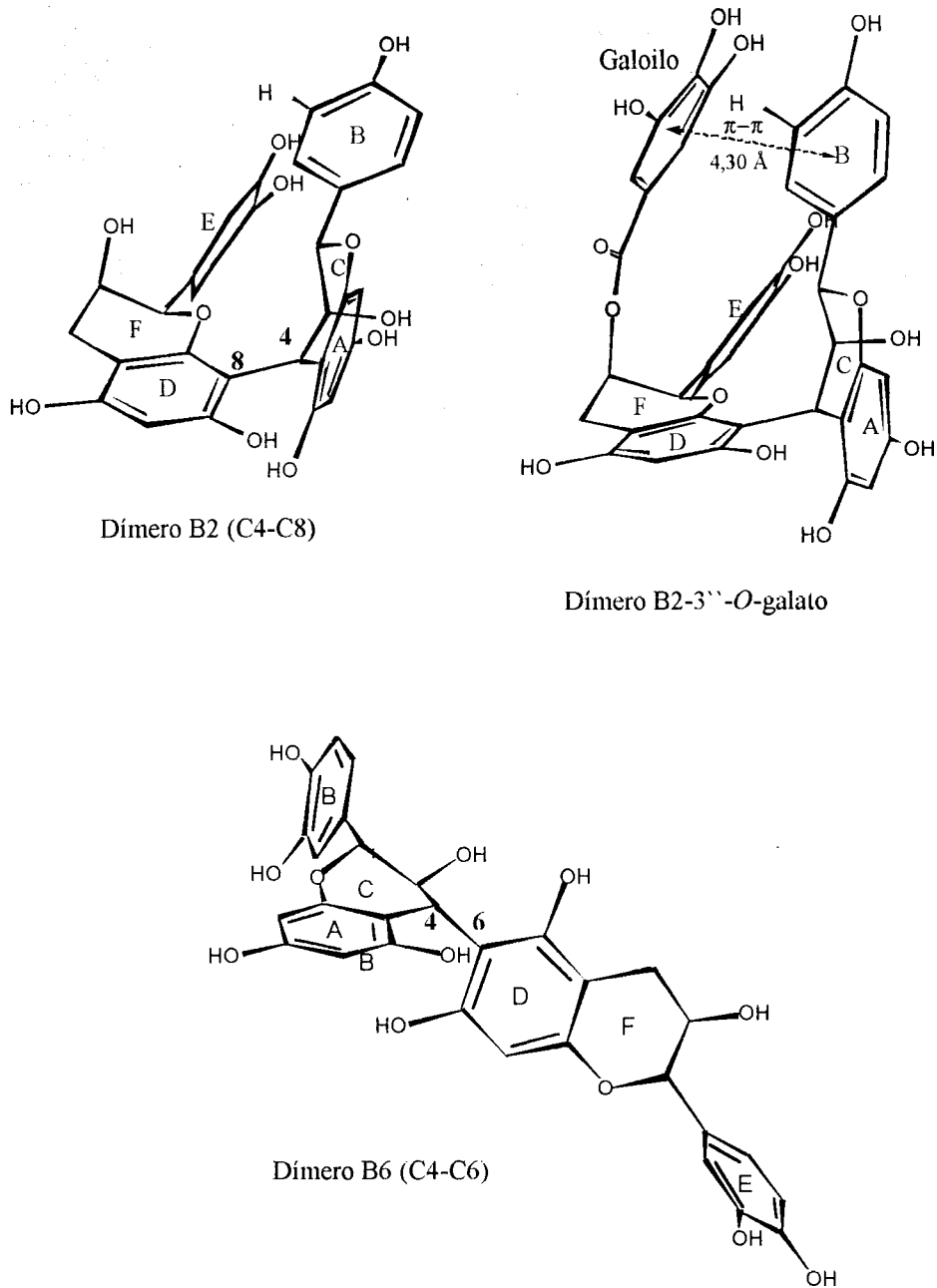


Figura 40- Conformação preferencial dos dímeros B6, B2 e B2-3''-O-galato, determinadas usando os parâmetros Allinger's MM2.

— PARTE 3 —

**ESTUDO *IN VIVO* DA ACTIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DE UM EXTRACTO DE  
GRAINHAS CONSTITUÍDO POR  
CATEQUINAS E PROCIANIDINAS  
OLIGOMÉRICAS**

### **Parte 3 - Estudo *in vivo* da Actividade Antioxidante de um Extracto de Grainhas Constituído por Catequinas e Procianidinas Oligoméricas**

Nesta parte do trabalho procedeu-se ao estudo *in vivo* da acção antioxidante de um extracto de grainhas constituído essencialmente por uma mistura de catequinas e procianidinas oligoméricas, recorrendo à quantificação da lipofuscina, indicadora do envelhecimento cerebral, depositada nos neurónios de ratos e na capacidade antioxidante total do plasma destes animais. Para o efeito foram administradas soluções aquosas e hidroalcoólicas com e sem polifenóis a diferentes grupos de animais durante seis meses. Foram estudadas as células piramidais CA3 do hipocampo já que nestas é evidente a acumulação de lipofuscina induzida pelo etanol. Tratam-se de células previamente estudadas em relação a este parâmetro (Borges *et al.*, 1986), que acumulam quantidades substanciais deste pigmento e que estão relacionadas com funções cognitivas de extrema importância como a aprendizagem e a memória.

## 1- Introdução

Tanto a farmacocinética dos 3-flavanóis (catequinas e procianidinas), isto é, a sua absorção, distribuição/biodisponibilidade, biotransformação e excreção, como a sua farmacodinâmica, que diz respeito aos efeitos bioquímicos e fisiológicos e seus mecanismos de acção no organismo, necessitam ainda de muito estudo.

Vários factores limitam a absorção dos 3-flavanóis e, conseqüentemente a sua disponibilidade no organismo. Características como o tamanho, a forma, a solubilidade no local de absorção, grau de ionização e lipossolubilidade, bem como a interacção com outros compostos, determinam de forma decisiva a extensão de absorção destes polifenóis. As procianidinas mais condensadas, devido ao seu elevado peso molecular, parecem não ser capazes de atravessar directamente a barreira intestinal. Por outro lado, as procianidinas podem interactuar com determinados nutrientes como proteínas e certos minerais e formar complexos que devido às suas dimensões não conseguem atravessar a barreira intestinal e são excretados nas fezes e urina (aproximadamente 50%) (Laparra *et al.*, 1977; Masquelier, 1988; Santos Buelga *et al.*, 2000). Já no interior do organismo, a interacção dos polifenóis com proteínas plasmáticas como a albumina pode limitar a sua distribuição.

Em termos clínicos, mais importante que a absorção é a biodisponibilidade dos compostos, isto é, a quantidade relativa de dado composto que atinge o seu local de acção. Estudos realizados apontam para uma extensa metabolização das formas mais polimerizadas das procianidinas antes e após a sua absorção, com conseqüente limitação da sua biodisponibilidade (Laparra *et al.*, 1977; Masquelier, 1988). Estudos realizados comprovaram a rápida absorção das procianidinas ou seus derivados logo após a sua ingestão e a sua distribuição preferencial pelo organismo (aorta, fígado, rins e cérebro) (Masquelier, 1988). O rápido influxo das procianidinas, e dos compostos em geral, nestes órgãos poderá dever-se à elevada permeabilidade das respectivas membranas endoteliais, enquanto que no cérebro a internalização poderá dever-se ao elevado fluxo sanguíneo que aí chega.

Na dieta mediterrânea, uma das principais fontes de obtenção de 3-flavanóis é o vinho, nomeadamente o vinho tinto cujo teor nestes compostos pode variar entre 1-3 g/L (Gaulejac *et al.*, 1999). Estudos realizados demonstraram que o vinho tinto exerce um efeito preventivo face ao desenvolvimento de arteriosclerose e doenças cardiovasculares (Masquelier, 1988; Frankel *et al.*, 1993, 1995; Simonetti *et al.*, 1996; Vinson *et al.*, 1995; Carbonneau *et al.*, 1997; Ivanov *et al.*, 2001). No entanto, o consumo de vinho suscita ainda muita controvérsia dados os efeitos nefastos do etanol.

O consumo crónico de etanol constitui assim um factor de risco de arteriosclerose e doenças cardiovasculares inerentes (Lochner *et al.*, 1994; Regan, 1990; Abdulla e Badawy, 2001), reduz a eficiência do sistema imunitário (Masquelier, 1988), provoca sérias lesões no aparelho digestivo e principalmente no sistema nervoso central (Andrade *et al.*, 1988; Cadete-Leite *et al.*, 1989; Lukoyanov *et al.*, 1999) como a acumulação de lipofuscina (Freund, 1982; Tavares *et al.*, 1985; Borges *et al.*, 1986), e está ainda associado ao aumento da incidência de cancro devido à indução de oxidases, que se traduz numa acumulação de agentes carcinogénicos activos e metabolitos tóxicos (Allebeck e Olsen, 1998; Reid *et al.*, 1999; Schlorff *et al.*, 1999). Os compostos flavonóides parecem ser capazes de neutralizar estes efeitos nocivos do etanol pela protecção do endotélio vascular e do tracto digestivo superior conferida pela interacção com determinadas proteínas e através da sua potencial acção antioxidante, face à oxidação de lípidos, proteínas e DNA. É de salientar no entanto que esta potencial acção neutralizadora apenas será válida numa situação de consumo moderado, já que o excesso de etanol provoca um desequilíbrio total do metabolismo.

A nível cerebral os conhecimentos da actividade antioxidante dos polifenóis são ainda mais escassos e praticamente inexistente no caso dos 3-flavanóis (Sun *et al.*, 1999).

### 1.1- Deposição de lipofuscina no cérebro

A lipofuscina é um pigmento amarelo/castanho auto-fluorescente constituído por proteínas e ácidos gordos oxidados que se acumula durante o envelhecimento em zonas preferenciais do organismo como os lisosomas das células do fígado, do cérebro e do coração. O cérebro apresenta-se particularmente sensível aos danos oxidativos, e conseqüentemente à deposição de lipofuscina, induzida ou não pelo consumo de álcool, devido à abundância de ácidos gordos polinsaturados, substratos preferenciais da peroxidação lipídica, e ao baixo nível de defesas antioxidantes (Riley *et al.*, 1978; Barnes *et al.*, 1981, Sun *et al.*, 1999).

A acumulação deste pigmento constitui um dos indicadores citológicos mais sólidos do envelhecimento, sendo por isso usado como um importante biomarcador (Brunk *et al.*, 1992). Apesar da formação de lipofuscina ser insuficiente para a caracterização do envelhecimento, é aceite que o aumento da sua formação está sem dúvida associada às alterações do metabolismo celular relacionado com o avanço da idade.

Existe ainda muita controvérsia quanto à formação de lipofuscina, mas existem fortes evidências que os lisosomas primários e os corpos multivesiculares podem constituir formas transitórias deste pigmento (Cadete-Leite *et al.*, 1988 (a)). Quanto aos respectivos mecanismos bioquímicos, pensa-se estarem envolvidas a formação e actuação oxidativa de

espécies reactivas de oxigénio e a actividade hidrolítica de enzimas ao nível dos lisosomas (Brunk *et al.*, 1992).

É aceite que durante o envelhecimento ocorrem profundas alterações nos ácidos nucleicos que se traduzem, entre outras, em modificações da maquinaria enzimática lisosomal. Os lisosomas têm como função reciclar metabolitos celulares, transformando-os em moléculas mais simples que posteriormente atravessam a membrana lisosomal, e no citosol são utilizados na biossíntese de novas moléculas. Quando as enzimas lisosómicas estão modificadas, estas não são capazes de cumprir a sua função e acumulam-se macromoléculas no interior dos lisosomas, as quais acabam por sofrer oxidação por contacto com oxidantes radicalares ou por actuação oxidativas de enzimas lisosomais, e formam lipofuscina (Manzabadi *et al.*, 1991).

Por outro lado, durante o envelhecimento os processos oxidativos da cadeia respiratória mitocondrial sofrem também alterações que se traduzem numa produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio como o  $H_2O_2$  (Sohal e Brunk, 1992). Esta molécula ao penetrar nos lisosomas vai-se transformar em  $HO^\bullet$ , via reacção de Fenton catalisada pelo ferro, e este radical vai oxidar as macromoléculas presentes no interior dos lisosomas e os próprios constituintes do organelo, nomeadamente as proteínas e os ácidos gordos das membranas fosfolipídicas.

Da autooxidação de substratos lipídicos resultam hidropéroxidos que se decompõem em compostos com grupos carbonilo como o malonaldeído e outros aldeídos (Halliwell *et al.*, 1989). Os aldeídos formados estabelecem ligações do tipo “cross-link” com os grupos amino de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos das quais resultam biomoléculas altamente polimerizadas incapazes de serem degradadas pelas enzimas lisosómicas e que se depositam sob a forma de lipofuscina (Constantinides *et al.*, 1986; Sundelin *et al.*, 2001).

Assim, a velocidade do fenómeno de lipofuscinogénese depende de vários factores: i) velocidade de autofagocitose e/ou fagocitose de material para os lisosomas; ii) eficiência das enzimas lisosómicas em degradarem esse material; iii) capacidade da célula exocitar resíduos não degradados; iv) extensão de peroxidação nos lisosomas e no meio envolvente. Por seu lado, o grau de peroxidação depende da velocidade de formação e eliminação das espécies  $O_2^\bullet$  e  $H_2O_2$ , da quantidade de antioxidantes, nomeadamente a vitamina E, da duração do processamento das macromoléculas e ainda do teor de ferro no interior e exterior dos lisosomas (Brunk *et al.*, 1992).

Numa fase inicial, a lipofuscina pode funcionar como um reservatório de material oxidado que, por se encontrar aprisionado no interior dos lisosomas, não constitui qualquer perigo para

a célula; no entanto, quando a porção de citoplasma ocupado pela lipofuscina ultrapassa um determinado limite, alegadamente por razões volumétricas, este pigmento começa a interferir com as funções celulares (Sundelin *et al.*, 2001). Verificou-se que neurónios contendo uma elevada quantidade de lipofuscina apresentavam uma menor porção de RNA e a perda de funções específicas em áreas como o hipotálamo, hipocampo e cerebelo (Constantinides *et al.*, 1986).

Sob condições normais, isto é, durante o envelhecimento biológico, a formação de lipofuscina é relativamente lenta e progressiva já que os lisosomas funcionam eficazmente e a actuação degenerativa das espécies reactivas de oxigénio é minimizada, no entanto como este pigmento não é eliminado da célula, ele acumula-se em função do tempo e reflecte o estado metabólico celular. No entanto, algumas situações contribuem para uma acumulação excessiva de lipofuscina. Basicamente dois mecanismos são responsáveis por essa deposição anormal (Sohal *et al.*, 1986):

- danos nas membranas celulares provocada por um aumento da actividade peroxidativa lipídica resultante por exemplo de uma situação de hipoxia cerebral;
- acção de um fármaco oxidante ou alterações na maquinaria lisosomal que provocam um desequilíbrio no processo oxidativo celular.

Como já foi referido, o etanol provoca sérias lesões no sistema nervoso central de entre as quais se salienta a alteração do número e estrutura de organelos celulares (Tavares *et al.*, 1982, 1985), formação de placas senis (Paula-Barbosa *et al.*, 1984), o empobrecimento das arborizações dendríticas (Tavares *et al.*, 1983), a morte neuronal (Tavares e Paula-Barbosa, 1982), a redução de contactos sinápticos (Cadete-Leite *et al.*, 1988 (a) e (b), 1989) e ainda a deposição precoce e progressiva de lipofuscina (Borges *et al.*, 1986). Estas alterações assemelham-se àquelas observadas nos neurónios de animais envelhecidos (Mann *et al.*, 1978; Brizzee *et al.*, 1979), o que correlaciona o consumo prolongado de álcool com a senescência neuronal precoce.

O álcool contribui assim para a deposição de lipofuscina principalmente pela indução da peroxidação lipídica. Este efeito pode ocorrer directamente ou de uma forma indirecta através de seus derivados (acetaldeído). As propriedades hidrofóbicas do etanol facilitam a sua penetração nas membranas celulares e a ocorrência de inúmeros distúrbios celulares: i) desorganização das cadeias acil fosfolipídicas e aumento da fluidez da membrana (Ollat *et al.*, 1988); ii) alteração da funcionalidade de proteínas transmembranares (Sun *et al.*, 1999); iii) alterações nas enzimas lisosomais (Mezey *et al.*, 1976); iv) gasto de inúmeras vitaminas incluindo as antioxidantes vitamina E e C (Mitchell *et al.*, 1998); v) activação dos receptores

de glutamato responsáveis por um influxo massivo de cálcio e consequente acumulação de radicais livres (Farooqui *et al.*, 1991). A ocorrência conjunta destas alterações traduz-se num aumento notório da actividade peroxidativa neuronal.

Por outro lado, o etanol pode actuar indirectamente através de seus metabolitos (acetaldeído e radicais livres) (Eysseric *et al.*, 2000). O etanol é extensamente metabolizado no fígado pela enzima álcool desidrogenase e origina acetaldeído, que por sua vez é oxidado a acetato pela aldeído oxidase ou xantina oxidase, dando origem a espécies reactivas de oxigénio (Fridovich, 1989; Gonthier *et al.*, 1991; Nordmann *et al.*, 1992). O acetaldeído, tal como outros aldeídos, pode formar aductos com proteínas e oxidar os seus grupos sulfidrílo, com consequente polimerização (Sun *et al.*, 1999).

Em 1955, Courville realizou um estudo no qual observou macroscopicamente e histologicamente cérebros de alcoólicos crónicos com idades compreendidas entre os 40 e 50 anos e ao compará-los com indivíduos não alcoólicos com idade superior a 70 anos concluiu que as alterações eram muito semelhantes. Esta mesma semelhança foi constatada em modelos experimentais biológicos (Tavares *et al.*, 1982, 1983). Assim surgiu a ideia do álcool como indutor do envelhecimento neuronal. Animais jovens submetidos a uma alcoolização crónica apresentam após 6 meses de tratamento uma quantidade de lipofuscina nos neurónios equivalente à normalmente apresentada por animais com 25 meses de idade (Tavares *et al.*, 1983, 1985).

As defesas antioxidantes enzimáticas (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) e os agentes neutralizadores de radicais livres como as vitaminas E, C entre outros desempenham uma protecção primordial a nível cerebral face aos danos oxidativos. Estudos realizados por Brunk (1992) revelaram uma relação inversa entre a concentração de vitamina E e a formação de lipofuscina, reforçando a teoria da peroxidação lipídica como mecanismo base da lipofuscinogénese.

## **1.2- Capacidade antioxidante total do plasma**

Existe uma variedade enorme de compostos no plasma susceptíveis de sofrerem oxidação, nomeadamente moléculas lipídicas, no entanto este processo é impedido ou retardado pelos antioxidantes nele presentes. Apesar da importante acção antioxidante atribuída à vitamina E no organismo, a sua contribuição para a capacidade antioxidante total do plasma é de apenas 5-10%, enquanto o urato contribui em cerca de 35-65%, o ascorbato com 0-24% e as proteínas plasmáticas com 10-50%. Esta acção das proteínas pode ser explicada pela presença de átomos de hidrogénio relativamente lábeis, como é o caso do grupo hidroxilo (OH) da

tirosina e o grupo sulfidrilo (SH) da cisteína, entre outros, que podem actuar como antioxidantes (Wayner *et al.*, 1985). No entanto, a relevância biológica da vitamina E advém não da sua abundância relativa mas sim do seu carácter lipofílico e do facto de poder ser regenerada por actuação sinérgica com outros antioxidantes (Wayner *et al.*, 1987).

O plasma enquanto sistema biológico de estudo acarreta uma grande fonte de variabilidade como o estado metabólico do ser vivo, momento de amostragem, complexidade da sua composição, presença de elementos indesejáveis, etc., para além de factores experimentais como a temperatura, pressão, ou outros de ordem experimental, que podem influenciar de forma determinante o parâmetro em estudo. Para minimizar o efeito interferente destes factores recorre-se frequentemente ao uso de um antioxidante que funciona como padrão interno. O trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E é um dos padrões usados mais frequentemente.

A eficiência antioxidante total do plasma pode ser então expressa pelo parâmetro *TRAP*, “*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*”. A determinação do TRAP envolve a medição do período de tempo durante o qual uma amostra de plasma resiste à peroxidação lipídica ( $t_i(\text{plasma})$ ) quando submetida ao ataque de radicais gerados a uma velocidade constante e conhecida ( $R_i$ ), como o caso dos radicais peroxilo derivados do AAPH, como descreve a equação [1] (Wayner *et al.*, 1985):

$$\text{TRAP} = R_i t_i(\text{plasma}) \quad [1]$$

O TRAP traduz o nº de moles de radicais peroxilo neutralizados por litro de plasma.

O valor de  $R_i$  pode ser obtido por adição de uma quantidade conhecida de trolox à amostra de plasma após o esgotamento dos antioxidantes endógenos, isto é, após a fase de inibição induzida pelo plasma. O trolox induz um segundo período de inibição,  $t_i(\text{trolox})$ , que permite determinar a velocidade de produção de radicais peroxilo, tendo em conta a concentração ( $[\text{trolox}]$ ) e o factor estequiométrico ( $n$ ) do trolox, como descreve a equação [2]:

$$R_i = n [\text{trolox}] / t_i(\text{trolox}) \quad [2]$$

O factor estequiométrico,  $n$ , representa o nº de radicais peroxilo neutralizados por cada molécula de antioxidante e assume o valor 2.0 para o trolox, tal como para a vitamina E (Barclay *et al.*, 1984) e muitos compostos fenólicos (Barclay *et al.*, 1981).

Substituindo  $R_i$  na primeira expressão, vem:

$$\text{TRAP} = n [\text{trolox}] t_i(\text{plasma}) / t_i(\text{trolox}) \quad [3]$$

Trabalhos efectuados por Wayner mostraram que o plasma e o soro apresentam valores de TRAP semelhantes (1985).

No trabalho em causa, o potencial antioxidante total do plasma foi determinado pela monitorização do consumo de oxigénio, utilizando trolox como antioxidante padrão. O plasma foi submetido a uma autoxidação iniciada por radicais peroxilo derivados do AAPH e foi determinado o TRAP de cada amostra.

## 2- Material e Métodos

### 2.1- Animais e Dieta

Foram utilizados ratos da estirpe Wistar (Charles-River, Barcelona), do sexo masculino com 6 meses de idade no início da experiência. Estes foram divididos por 4 grupos, contendo cada um 6 elementos. Foram colocados 3 animais por gaiola e estes foram mantidos num biotério sob condições controladas de luz (ciclos de 12 h) e temperatura (23°C). Os animais foram submetidos a tratamento durante 6 meses, findos os quais, já com 1 ano de idade, foram analisados.

Os ratos dos diferentes grupos tinham à disposição uma ração (Letica, Barcelona) de composição e quantidade idênticas. Os regimes líquidos variaram segundo o grupo em causa:

- Grupo A: água (controlo);
- Grupo B: solução aquosa de catequinas e procianidinas oligoméricas (CP) (200 mg/L);
- Grupo C: etanol (20%) (controlo);
- Grupo D: solução etanólica (20%) com 200 mg/L de catequinas e procianidinas oligoméricas (CP).

A quantidade de comida e bebida ingeridas pelos animais de cada gaiola foi registada de 2 em 2 dias e as soluções de polifenóis renovadas. O peso dos animais foi registado semanalmente.

### 2.2- Composição do extracto polifenólico

O extracto polifenólico administrado aos animais foi obtido a partir de grainhas de uvas, de acordo com o método de isolamento e purificação descrito por Michaud (1971). Este extracto foi submetido a uma série de análises para determinar a sua composição em 3-flavanóis. A composição em catequinas e procianidinas foi determinada por uma conjugação de técnicas cromatográficas (cromatografia em coluna gel Toyopearl e HPLC), descritas na Parte 1. O teor do extracto em procianidinas totais foi determinado pela reacção de Bate-Smith.

Verificou-se que o extracto polifenólico era constituído quase na totalidade (>99%) por uma mistura de catequinas e procianidinas apresentando a seguinte composição (determinada por HPLC) (1 g de extracto): (+)-catequina 0.056 g; (-)-epicatequina-3-*O*-galato 0.050 g; (-)-epicatequina-galato 0.016 g; B1 0.237 g; B2 0.138 g; B3 0.032 g; B4 0.038 g; B5 0.026 g; B8 0.008 g; B2-3''-*O*-galato 0.151 g (3-flavanóis totais: 0.769 g). A restante massa do extracto correspondia a procianidinas mais polimerizadas.

### 2.3- Deposição de lipofuscina no cérebro

A quantidade de lipofuscina nos neurónios dos animais foi avaliada no final do tratamento (ao fim de seis meses) segundo o método descrito por Borges e colaboradores (1986).

Os animais foram anestesiados com uma solução aquosa de hidrato de cloral a 1% e perfundidos transcárdiacamente com a solução de perfusão (glutaraldeído (1%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato 0.12 M (pH 7.4)) durante 20-30 min (Palay e Chan-Palay, 1974).

Os cérebros dos animais foram removidos, as formações do hipocampo foram individualizadas e mergulhadas durante 2 horas na solução de perfusão. A formação do hipocampo foi cortada em blocos de pequenas dimensões (<1 mm de diâmetro) e tratados de acordo com os métodos descritos por Palay e Chan Palay (1974). De modo resumido o material foi lavado em tampão fosfato e ulteriormente processado para observação em microscopia electrónica de acordo com o método de rotina praticado no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto:

a) *osmicação*: o material permaneceu mergulhado numa solução de tetróxido de ósmio a 1% (em tampão fosfato 0.12 M) durante 2 h a 4°C e sob agitação;

b) *coloração*: após osmicação, o material foi lavado com água destilada e submetido a coloração pelo acetato de uranilo 1% (solução etanólica a 70%), durante 45 min e a 4°C;

c) *desidratação*: o material foi desidratado por imersão em soluções etanólicas de concentração crescente: 70°, 5 min; 80°, 5 min, 90°, 5 min, 95°, 15 min, etanol absoluto 15 min+15 min. Seguiu-se uma lavagem em óxido de propileno;

d) *inclusão*: os blocos foram mergulhados numa mistura óxido de propileno/Epon 1:1 (v/v). Ao fim de 30 min a solução foi renovada e os blocos permaneceram imersos mais 30 min. Seguidamente estes foram mergulhados em Epon durante 30 min a 60°C;

e) *polimerização*: o material permaneceu a 60°C durante 24 h.

O estudo morfométrico dos grânulos de lipofuscina foi realizado nas células piramidais da subdivisão CA3 da formação do hipocampo. De cada animal foram escolhidos três blocos. Foram realizados cortes ultrafinos com uma espessura de 70-90 nm de 3-4 células por bloco.

Procedeu-se à dupla coloração do material por forma a realizar a quantificação dos grânulos de lipofuscina:

a) o material foi mergulhado em acetato de uranilo 20% (em solução de metanol a 50%) durante 30 min e seguidamente seco a 30°C;

b) as amostras foram coradas numa solução aquosa de citrato de chumbo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  4%,  $\text{NaCH}_3\text{COOH}$  6%) durante 15 min e novamente secas a 30°C.

As células foram fotografadas com uma ampliação primária de 4000x e posteriormente estudadas com uma ampliação final de 12000x. Utilizaram-se os neurónios seccionados equatorialmente já que os grânulos de lipofuscina predominam nos pólos das células.

A quantificação da acumulação de lipofuscina foi realizada de acordo com as técnicas descritas por Weibel (1978). Mediram-se as áreas da célula e do núcleo com um MOP Videoplan e por diferença calculou-se a área do citoplasma ( $A_{\text{cit}}$ ). A razão entre a área dos grânulos de lipofuscina ( $A_{\text{lip}}$ ) e a área de citoplasma permitiu determinar a densidade volumétrica percentual dos grânulos do pigmento ( $V_v$ ), isto é, a fracção de citoplasma ocupada pela lipofuscina (expressão [4]).

$$V_v = A_{\text{lip}}/A_{\text{cit}} \times 100 \quad [4]$$

Procedeu-se igualmente à quantificação da área de citoplasma ocupada pelo compartimento lisosomal, isto é, pelos lisosomas e pelos corpos multivesiculares, por um processo idêntico ao praticado para os grânulos de lipofuscina.

Determinou-se o volume de algumas células de cada grupo e o volume dos respectivos núcleos tendo em conta a secção da amostra e a sua espessura por uma metodologia bastante complexa praticada no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto (Leal *et al.*, 1998). Por diferença calculou-se o volume do citoplasma ( $V_{\text{cit}}$ ) e multiplicando-se a densidade volumétrica da lipofuscina ou do compartimento lisosómico ( $V_v$ ) pelo respectivo volume de citoplasma obteve-se o volume de citoplasma ocupado pelos grânulos de lipofuscina ( $V_{\text{lip}}$ ) ou pelo compartimento lisosómico (expressão [5]).

$$V_{\text{lip}} = V_v \times V_{\text{cit}} \quad [5]$$

#### 2.4- Capacidade Antioxidante Total do Plasma

No final do tratamento, foram recolhidas amostras de sangue (~ 2 mL) de cada animal. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm durante 4 min e o sobrenadante foi novamente centrifugado à mesma velocidade durante 1 min. Recolheu-se o plasma e procedeu-se à determinação do TRAP. As amostras de plasma foram mantidas a -70°C sob atmosfera de árgon até à sua análise. A determinação do TRAP foi efectuada num eléctrodo de oxigénio

tipo Clark em célula fechada ao abrigo da luz, sob agitação e termostatização a 37°C. Foram colocados 2.00 mL de uma solução de tampão fosfato (110 mM NaCl, 20 mM fosfato, pH 7.4) na célula do electrodo e adicionaram-se 16.0  $\mu$ L de uma solução de AAPH 500 mM, de modo a obter uma concentração final de AAPH 4 mM. Após 1 min adicionou-se uma alíquota de plasma (33.0  $\mu$ L) e quando esgotado o conteúdo antioxidante do plasma (início da fase de propagação), foram adicionados 67.0  $\mu$ L de uma solução de trolox 100  $\mu$ M (concentração final 4.25  $\mu$ M).

A concentração de AAPH e de trolox, bem como a quantidade de plasma foram estudadas previamente de modo a que proporcionassem fases de inibição e propagação perceptíveis. Os períodos de indução do plasma e do trolox foram determinados como o intervalo de tempo entre o momento de adição do plasma ou do trolox, e a intersecção das tangentes às curvas de inibição ( $a_1$  e  $a_2$ ) e de propagação ( $b_1$  e  $b_2$ ) da oxidação para cada um deles (Figura 41). Calcularam-se os valores do parâmetro TRAP pela expressão [3].

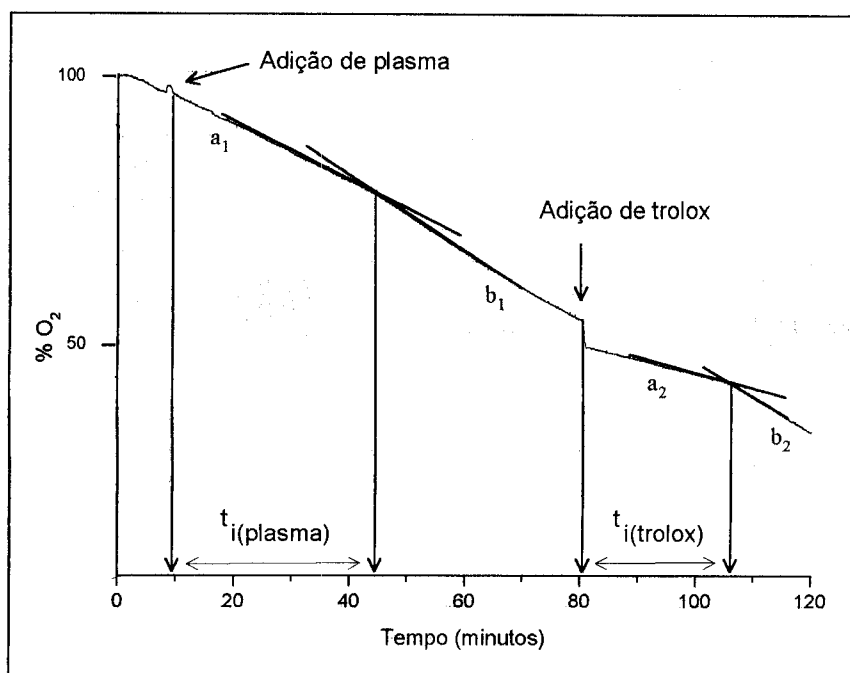


Figura 41– Monitorização do consumo de oxigênio durante a reacção de oxidação do plasma.  $a_1$ , tangente à curva de inibição da oxidação na presença de antioxidantes endógenos do plasma;  $b_1$ , tangente à curva de propagação da oxidação após esgotamento dos antioxidantes endógenos do plasma;  $a_2$ , tangente à curva de inibição da oxidação na presença de trolox;  $b_2$ , tangente à curva de propagação após esgotamento do trolox ( $t_i$ , período de indução).

### 3- Resultados e Discussão

#### 3.1- Deposição de lipofuscina no cérebro

A morfologia da subdivisão do hipocampo dos cérebros dos animais submetidos a tratamento com Água, Etanol+CP e Etanol está representada nas Figuras 42, 43 e 44, respectivamente. Os resultados da quantificação da lipofuscina e compartimento lisosomal (corpos multivesiculares, CMV, e lisosomas, lis) estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado pelo teste ANOVA-1 factor (Tabela 14) no qual se verificou se o tratamento tinha dado efeito, isto é, se os resultados para cada um dos parâmetros ( $V_v$  lip,  $V_v$  CMV+lis, volume lip, volume CMV+lis) eram significativamente diferentes. Realizou-se também uma análise dos resultados da densidade volumétrica ( $V_v$ ) e do volume dos grânulos de lipofuscina pelo teste de Tukey HSD por forma a identificar a origem da variabilidade, isto é, os elementos responsáveis pelas diferenças detectadas. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0.05$ .

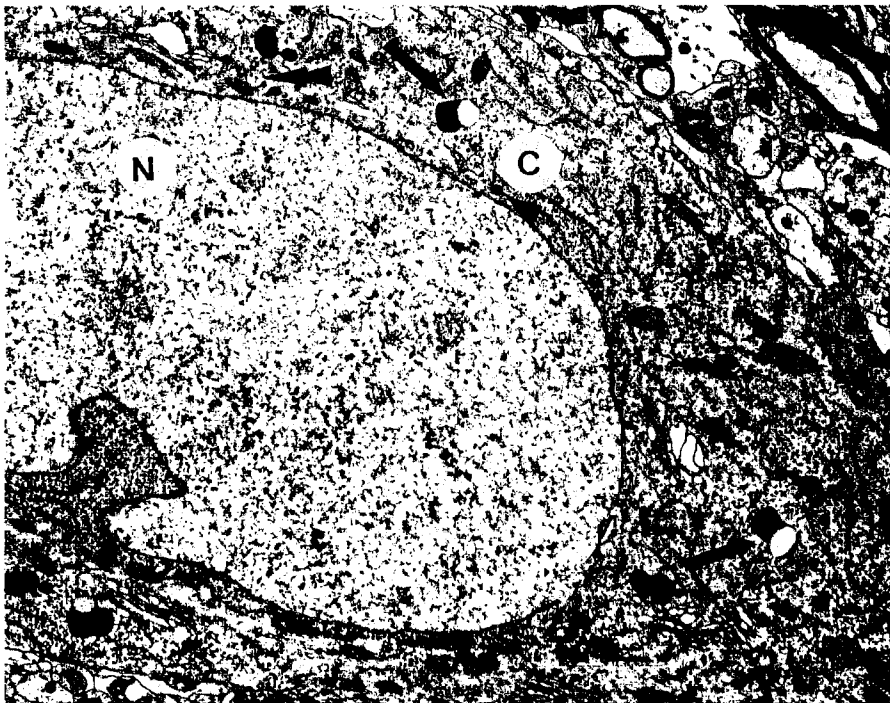


Figura 42- Célula da subdivisão CA3 do hipocampo de um animal submetido a tratamento com Água (Grupo A: Controlo) durante 6 meses (seta, grânulo de lipofuscina; cabeça de seta, lisosoma; dupla cabeça de seta, corpo multivesicular; c, célula; N, núcleo).

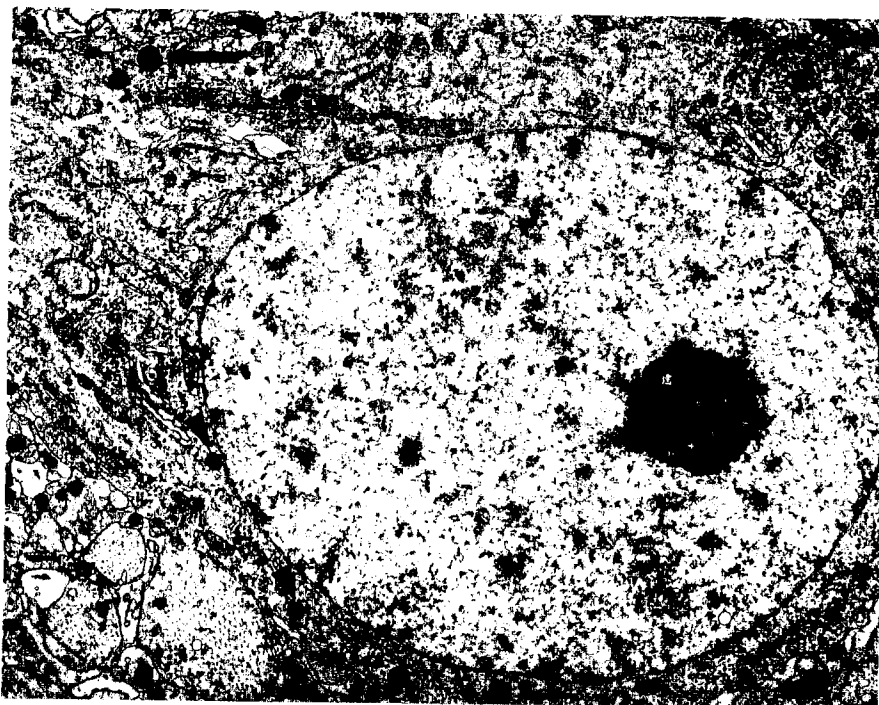


Figura 43- Célula da subdivisão CA3 do hipocampo de um animal submetido a tratamento com Etanol+CP (Grupo D) durante 6 meses (seta, grânulo de lipofuscina; cabeça de seta, lisosoma).

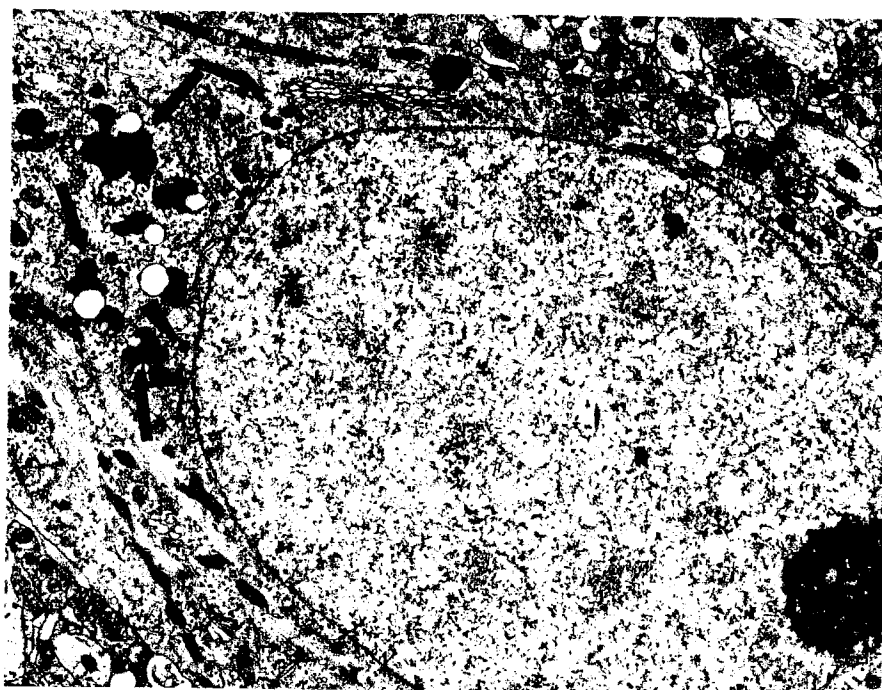


Figura 44- Célula da subdivisão CA3 do hipocampo de um animal submetido a tratamento com Etanol (Grupo C: Controle) durante 6 meses (seta, grânulo de lipofuscina; cabeça de seta, lisosoma).

Tabela 12- Valores da densidade volumétrica (Vv) e volume de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupados pelos grânulos de lipofuscina nos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas).

Grupo	LIPOFUSCINA			
	V <sub>v</sub>		Volume	
	%	Média ± desvio padrão	µm <sup>3</sup>	Média ± desvio padrão
<b>A: Água</b>	0.0159	0.0174 ± 0.0023	33.69	36.91 ± 4.96
	0.0174		36.87	
	0.0180		38.14	
	0.0189		40.05	
	0.0138		29.24	
	0.0205		43.44	
<b>B: Água + CP</b>	0.0168	0.0174 ± 0.0020	34.42	35.55 ± 4.03
	0.0205		42.00	
	0.0185		37.90	
	0.0151		30.94	
	0.0175		35.86	
	0.0157		32.17	
<b>C: Etanol</b>	0.0306	0.0352 ± 0.0034	63.98	73.53 ± 7.19
	0.0340		71.09	
	0.0403		84.26	
	0.0329		68.79	
	0.0374		78.20	
	0.0358		74.85	
<b>D: Etanol + CP</b>	0.0137	0.0210 ± 0.0061	30.66	46.93 ± 12.96
	0.0253		56.63	
	0.0286		64.01	
	0.0151		33.80	
	0.0227		50.81	
	0.0204		45.66	

Tabela 13- Valores da densidade volumétrica ( $V_v$ ) e volume ( $\mu\text{m}^3$ ) de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupados pelo compartimento lisossômico (corpos multivesiculares (CMV) e lisosomas) nos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas).

<b>CMV + LISOSOMAS</b>				
Grupo	$V_v$		Volume	
	%	Média $\pm$ desvio padrão	$\mu\text{m}^3$	Média $\pm$ desvio padrão
<b>A: Água</b>	0.0100		21.19	
	0.0088		18.65	
	0.0085		18.01	
	0.0098	0.0083 $\pm$ 0.0017	20.77	17.52 $\pm$ 3.54
	0.0060		12.71	
	0.0065		13.77	
<b>B: Água + CP</b>	0.0121		24.79	
	0.0096		19.67	
	0.0070		14.34	
	0.0039	0.0077 $\pm$ 0.0030	7.99	15.74 $\pm$ 6.16
	0.0084		17.21	
	0.0051		10.45	
<b>C: Etanol</b>	0.0112		23.42	
	0.0115		24.04	
	0.0187		39.10	
	0.0057	0.0113 $\pm$ 0.0046	11.92	23.52 $\pm$ 9.55
	0.0130		27.18	
	0.0074		15.47	
<b>D: Etanol + CP</b>	0.0077		17.23	
	0.0163		36.48	
	0.0125		27.98	
	0.0078	0.0097 $\pm$ 0.0041	17.46	21.71 $\pm$ 9.19
	0.0047		10.52	
	0.0092		20.59	

Tabela 14- Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) da densidade volumétrica ( $V_v$ ) e do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupados pelos grânulos de lipofuscina e pelo compartimento lisosómico (corpos multivesiculares (CMV) e lisosomas) nos animais dos 4 grupos ( $p < 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade).

Parâmetro	ANOVA		
	F g.l. (3, 20)	p	
<b>LIPOFUSCINA</b>	$V_v$ (%)	31.44	$< 1 \times 10^{-5}$
	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	28.58	$< 1 \times 10^{-5}$
<b>CMV + LISOSOMAS</b>	$V_v$ (%)	1.23	0.32
	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	1.15	0.38

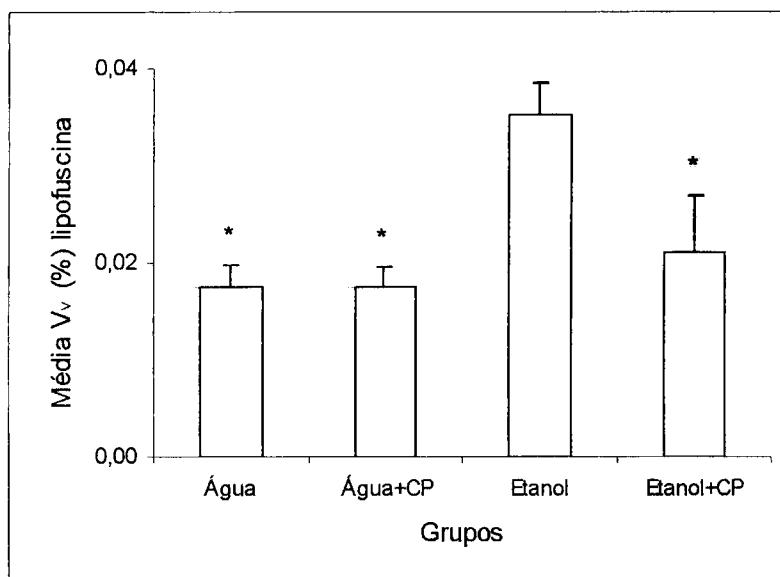


Figura 45- Valor médio e respectivo desvio padrão da densidade volumétrica ( $V_v$  %) do citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupada pelos grânulos de lipofuscina nos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) (\*  $p < 2 \times 10^{-4}$  vs. Etanol) (CP- catequinas e procianidinas).

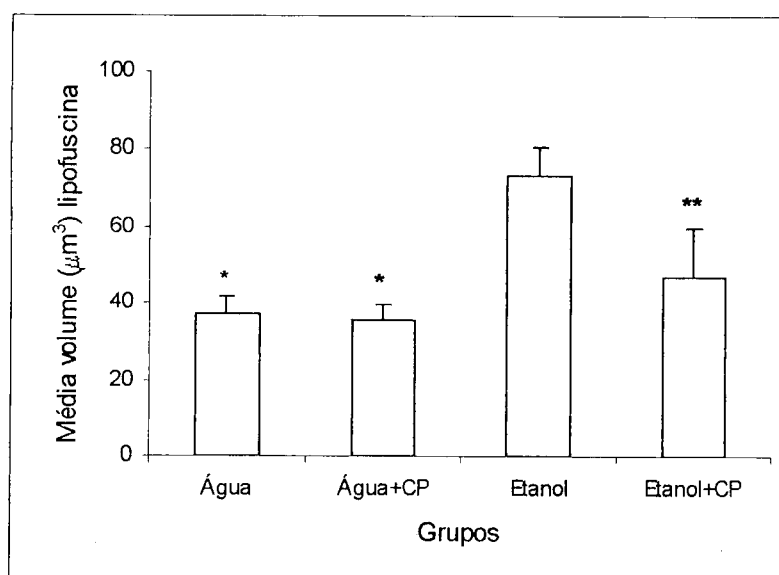


Figura 46- Valor médio e respectivo desvio padrão do volume de citoplasma das células CA3 do hipocampo ocupado pelos grânulos de lipofuscina nos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) (\*  $p < 2 \times 10^{-4}$ , \*\*  $p < 3 \times 10^{-4}$  vs. Etanol) (CP- catequinas e procianidinas).

A análise estatística (ANOVA-1 factor) revelou que os grupos estudados apresentaram diferenças significativas entre si no que respeita à quantidade de lipofuscina depositada no cérebro dos animais (Tabela 14,  $p < 0.05$ ), o mesmo não aconteceu com o compartimento lisosomal (Tabela 14,  $p > 0.05$ ).

O teste de Tukey HSD revelou que os animais do grupo C (Etanol) apresentaram uma quantidade de lipofuscina significativamente superior à dos restantes grupos e que os grupos A, B e D não apresentaram diferenças significativas entre si (Figuras 45 e 46). De facto, os animais do grupo D (Etanol+PC) apresentaram uma quantidade de lipofuscina no cérebro bastante inferior à dos animais do grupo C (Etanol) e semelhante à dos animais dos grupos A (Água) e B (Água+CP), o que significa que os polifenóis exerceram efeito protector face aos danos oxidativos do etanol. No entanto, os animais do grupo B (Água+PC) apresentavam uma quantidade de lipofuscina semelhante ao grupo A (Água) o que significa que não se verificou qualquer efeito dos polifenóis.

No que respeita ao compartimento lisosómico, isto é, aos corpos multivesiculares e aos lisosomas, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas entre os grupos, nos grupos C (Etanol) e D (Etanol+CP) constatou-se que o volume de citoplasma ocupado foi superior ao dos restantes grupos, sugerindo um aumento da actividade deste compartimento,

ou seja um aumento da actividade oxidativa, reforçando assim a teoria da estimulação dos processos oxidativos induzida pela ingestão de etanol.

### **3.2- Capacidade antioxidante total do plasma**

Os resultados da capacidade antioxidante do plasma foram expressos através do parâmetro TRAP, calculado a partir do período de indução ( $t_i$ ) proporcionado pelos antioxidantes endógenos de cada amostra de plasma relativamente ao trolox (padrão interno) (Tabela 15, Figura 47).

A análise estatística dos resultados foi semelhante à efectuada na avaliação da deposição de lipofuscina no cérebro (ANOVA-1 factor e teste Tukey HSD). Os grupos que ingeriram procianidinas apresentaram um valor de TRAP superior aos respectivos controlos; no entanto, a análise estatística (ANOVA-1 factor) revelou que essa diferença não era significativa (Tabela 16  $p=0.102$ ) devido à variabilidade registada dentro de cada grupo. Este facto talvez possa ser explicado pelo momento de recolha das amostras de sangue não coincidir com a concentração máxima de polifenóis em circulação e estes já terem sido absorvidos, eliminados ou mesmo metabolizados pelo animal, daí não terem sido registadas diferenças significativas. Por outro lado, o método adoptado, medição do consumo de oxigénio por um eléctrodo do tipo Clark, apresenta-se extremamente sensível pelo que os factores inerentes ao metabolismo de cada animal poderão induzir diferenças importantes. A variabilidade inerente aos factores de ordem experimental como por exemplo a temperatura, pressão, concentração de radical) foi minimizada por utilização do trolox como padrão interno.

Tabela 15- Valores do parâmetro TRAP dos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas).

Grupo	t <sub>1</sub> /s		TRAP μmol rad. peroxilo/L <sub>plasma</sub>	Média ± desvio padrão
	Plasma	Trolox		
<b>A: Água</b>	29.0	36.7	407	617 ±142
	22.8	21.3	551	
	29.5	19.6	775	
	25.8	23.7	561	
	32.9	26.7	635	
	39.7	26.5	772	
<b>B: Água + CP</b>	36.3	23.0	813	783±150
	34.8	25.9	692	
	31.5	22.6	718	
	37.0	18.0	1059	
	32.7	26.7	631	
	36.8	24.1	787	
<b>C: Etanol</b>	32.8	23.2	728	638 ±110
	19.7	22.1	459	
	31.1	23.7	676	
	29.0	23.3	641	
	31.1	21.2	756	
	23.6	21.4	568	
<b>D: Etanol + CP</b>	53.5	36.6	753	790 ±178
	49.7	23.3	1099	
	29.8	25.0	614	
	28.1	21.4	676	
	35.2	25.8	703	
	30.3	17.5	892	

Tabela 16- Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) do parâmetro TRAP dos animais dos quatro grupos ( $p > 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade).

Parâmetro	ANOVA	
	F g.l. (3, 20)	p
TRAP	2.36	0.102

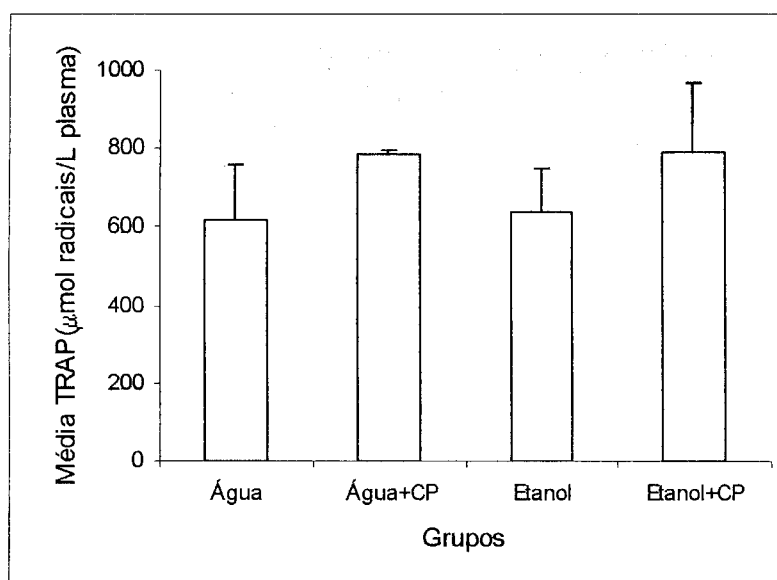


Figura 47- Valor médio e respectivo desvio padrão do parâmetro TRAP dos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) no final do tratamento (6 meses) (CP- catequinas e procianidinas).

### 3.3- Influência dos 3-flavanóis na alimentação e peso dos animais

Ao longo de todo o tratamento (6 meses) com 3-flavanóis foram monitorizados três parâmetros nos grupos de animais estudados: ração, bebida e peso. Pelo teste ANOVA foi possível avaliar a diferença entre os vários grupos (efeito do tratamento) (Tabela 17), e dentro de cada grupo a variância entre as várias semanas de tratamento (efeito da duração do tratamento) (Tabela 18), e pelo teste Tukey HSD foram identificados os elementos responsáveis por essa diferença (Figuras 48-53).

### 3.3.1- Efeito do tratamento com 3-flavanóis

Tabela 17- Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) relativa à variância entre grupos (efeito do tratamento com 3-flavanóis) dos parâmetros ração, bebida e peso dos animais ( $p < 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade).

Parâmetro	Variância entre grupos	
	<i>F</i> (g.l. 3, 80)	<i>p</i>
Ração	149.75	$< 1 \times 10^{-5}$
Bebida	184.78	$< 1 \times 10^{-5}$
Peso	8.17	$8 \times 10^{-5}$

#### 3.3.1.1- Efeito do tratamento com 3-flavanóis na ração ingerida

A análise estatística (ANOVA-1 factor) demonstrou, com um nível de significância de 5%, que as quantidades de ração ingeridas pelos vários grupos (A, B, C e D) foram significativamente diferentes ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ) (Tabela 17), pelo que o tratamento teve um efeito considerável. No entanto, o teste Tukey HSD revelou que os grupos C (Etanol) e D (Etanol+PC) não demonstraram diferenças significativas entre si (Figura 48). É de referir que os animais dos grupos C (Etanol) e D (Etanol+CP) ingeriram uma quantidade de ração significativamente inferior aos restantes grupos.

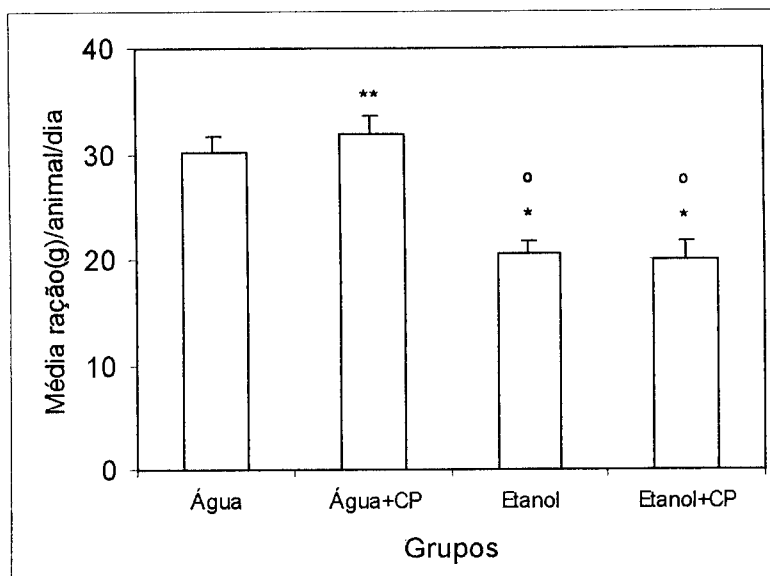


Figura 48– Valor médio da quantidade de ração ingerida/animal/dia pelos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) durante o tratamento (6 meses) e respectivo desvio padrão. \*  $p < 2 \times 10^{-4}$ , \*\*  $p < 5 \times 10^{-3}$  vs. Água; °  $p < 2 \times 10^{-4}$  vs. Água+CP (CP- catequinas e procianidinas).

### 3.3.1.2- Efeito do tratamento com 3-flavanóis na bebida ingerida

O tratamento estatístico (ANOVA-1 factor) revelou, com um grau de confiança de 95%, que as quantidades de bebida ingeridas pelos vários grupos são significativamente diferentes ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ) (Tabela 17). No entanto, o teste Tukey HSD revelou que os grupos A (Água) e B (Água+CP) não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 49).

Verificou-se que os animais dos grupos C (Etanol) e D (Etanol+CP) ingeriram uma quantidade de bebida significativamente inferior à dos restantes grupos pelo facto do álcool lhes causar uma sensação gustativa desagradável, tal como verificado noutros estudos anteriores (Cadete-Leite *et al.*, 1995, 1997; Paula-Barbosa *et al.*, 1991 (a) e (b); Simonetti *et al.*, 1996).

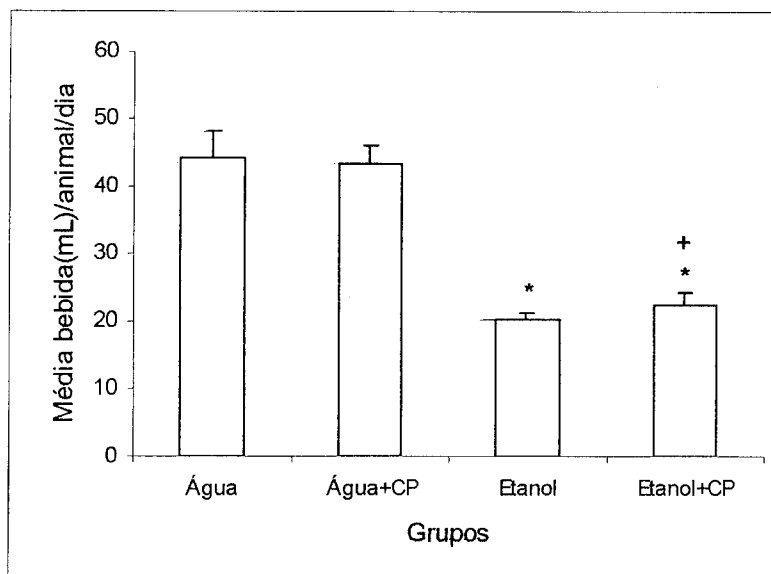


Figura 49– Valor médio da quantidade de bebida ingerida/animal/dia pelos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) durante o tratamento (6 meses) e respectivo desvio padrão. \*  $p < 2 \times 10^{-4}$  vs. Água e vs. Água+CP; +  $p < 0.04$  vs. Etanol (CP- catequinas e procianidinas).

### 3.3.1.3- Efeito do tratamento com 3-flavanóis no peso

A análise estatística (ANOVA-1 factor) revelou, com um nível de significância de 5%, que os pesos médios dos vários grupos são significativamente diferentes ( $p = 8 \times 10^{-5}$ ) (Tabela 17), embora os grupos A (Água) vs B (Água+CP) e C (Etanol) vs D (Etanol+CP) não apresentem entre si diferenças notórias (Figura 50).

É de salientar que os animais dos grupos A (Água) e B (Água+CP) apresentavam um peso corporal superior aos restantes animais.

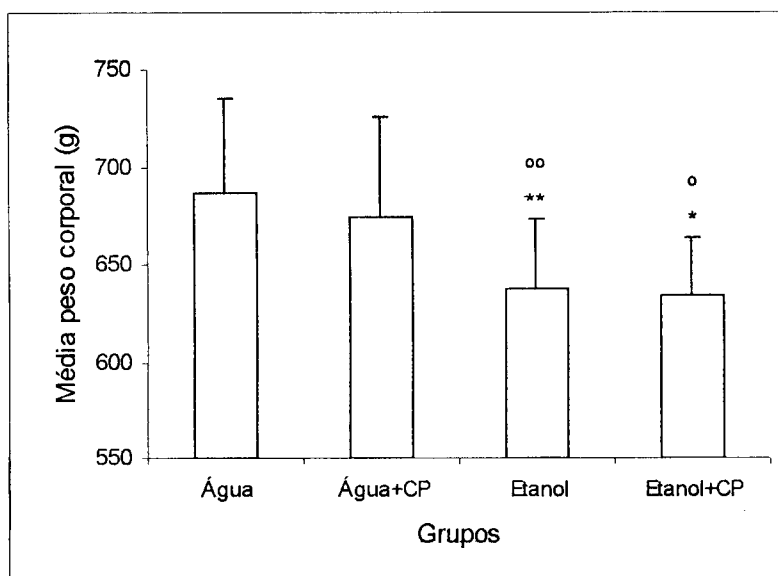


Figura 50– Valor médio do peso corporal dos animais dos grupos A (Água), B (Água+CP 200 mg/L), C (Etanol 20%) e D (Etanol 20%+CP 200 mg/L) durante o tratamento (6 meses) e respectivo desvio padrão. \*  $p < 9 \times 10^{-4}$ , \*\*  $p < 2 \times 10^{-3}$  vs. Água; °  $p < 0.02$ , °°  $p < 0.03$  vs. Água+CP (CP- catequinas e procianidinas).

### 3.3.2- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis

Tabela 18- Resultados da análise estatística (ANOVA-1 factor) relativa à variância entre semanas (efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis) dos parâmetros ração, bebida e peso dos animais dos quatro grupo ( $p < 0.05$ ) (g.l., graus de liberdade).

Parâmetro	Grupo	Variância entre semanas	
		<i>F</i> (g.l. 11, 58)	<i>p</i>
Ração	A: Água	2.85	$< 5 \times 10^{-5}$
	B: Água+CP	4.89	$< 3 \times 10^{-5}$
	C: Etanol	2.92	$< 4 \times 10^{-3}$
	D: Etanol+CP	4.08	$< 2 \times 10^{-5}$
Bebida	A: Água	6.06	$< 1 \times 10^{-5}$
	B: Água+CP	4.31	$< 2 \times 10^{-4}$
	C: Etanol	2.10	0.035
	D: Etanol+CP	2.62	$< 9 \times 10^{-3}$
Peso	A: Água	23.01	$< 1 \times 10^{-5}$
	B: Água+CP	11.63	$< 1 \times 10^{-5}$
	C: Etanol	7.37	$< 1 \times 10^{-5}$
	D: Etanol+CP	2.15	0.035

#### 3.3.2.1- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis na ração ingerida

O tratamento estatístico (ANOVA-1 factor) permitiu concluir, com 5% de significância, que a quantidade de ração ingerida por cada grupo ao longo dos 6 meses foi significativamente diferente (Grupo A:  $p < 5 \times 10^{-5}$ , Grupo B:  $p < 3 \times 10^{-5}$ , Grupo C:  $p < 4 \times 10^{-3}$ , Grupo D:  $p < 2 \times 10^{-5}$ ) (Tabela 18). O teste Tukey HSD revelou que, na generalidade, foram as semanas 8, 10, 20 e 22 as que mais contribuíram para essa diferença em quase todos os grupos (Figura 51).

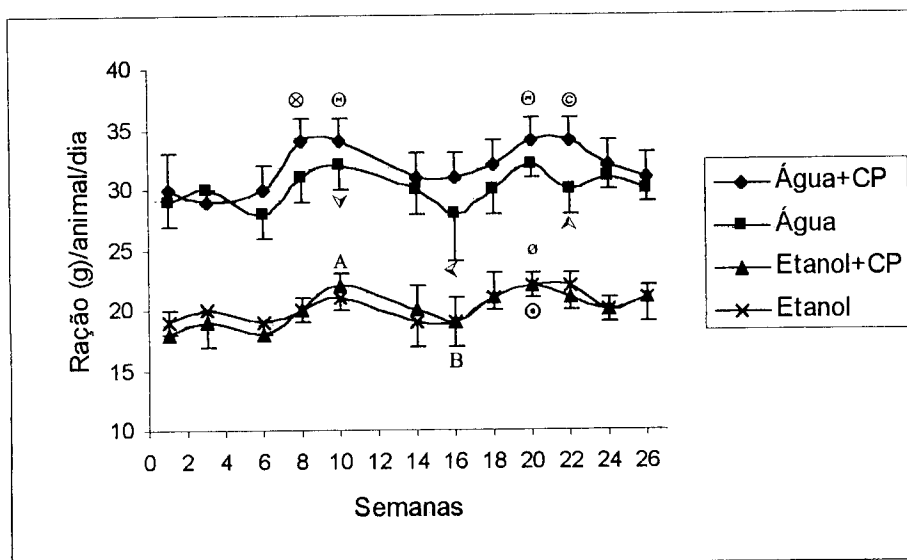


Figura 51- Valores médios da ração ingerida/animal/dia por cada grupo durante 6 meses e respectivos desvios padrão (Água+CP:  $p < 0,05$  vs (⊗) semana 6; (⊖) semanas 1,3,6; (⊙) semanas 3,6; Água:  $p < 0,05$  vs (∇) semana 6; (◁) semana 10; (△) semanas 6,14; Etanol+CP:  $p < 0,05$  vs (A) semanas 1,6; (B) semanas 10; (ø) semanas 1,6,16; Etanol:  $p < 0,05$  vs (⊙) semana 6) (CP- catequinas e procianidinas).

### 3.3.2.2- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis na bebida ingerida

A análise estatística (ANOVA-1 factor) revelou, com um grau de significância de 5%, que a quantidade de bebida ingerida por cada grupo durante o tratamento foi significativamente diferente (Grupo A:  $p < 1 \times 10^{-5}$ , Grupo B:  $p < 2 \times 10^{-4}$ , Grupo C:  $p = 0,035$ ; Grupo D:  $p < 9 \times 10^{-3}$ ) (Tabela 18). O teste Tukey HSD revelou que foram as semanas 18-24 as que mais contribuíram para essa diferença nos grupos A (Água) e B (Água+CP), e a semana 16 nos grupos C (Etanol) e D (Etanol+CP) (Figura 52).

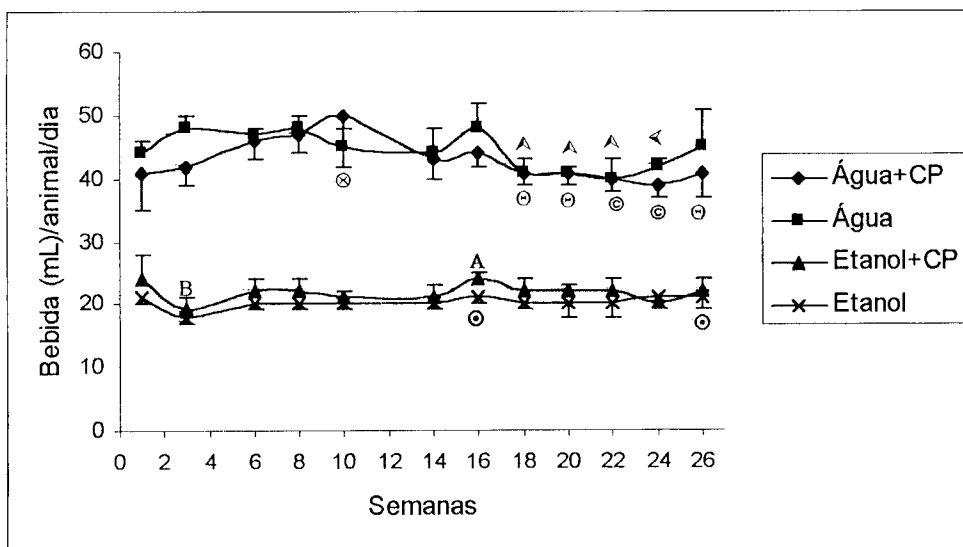


Figura 52- Valores médios da bebida ingerida/animal/dia por cada grupo durante 6 meses e respectivos desvios padrão (Água + CP:  $p < 0,05$  vs (⊗) semana 1; (⊖) semana 8; (⊙) semanas 6,8; Água:  $p < 0,05$  vs (^) semanas 3,6,8,16; (<) semanas 3,8,16; Etanol + CP:  $p < 0,05$  vs (B) semana 1; (A) semana 3; Etanol:  $p < 0,05$  vs (⊙) semana 3) (CP- catequinas e procianidinas).

### 3.3.2.3- Efeito da duração do tratamento com 3-flavanóis no peso

A análise estatística (ANOVA-1 factor) revelou, com um grau de confiança de 95%, que o peso corporal dos animais de cada grupo sofreu uma variação significativa ao longo do tratamento (Grupo A,B,C:  $p < 1 \times 10^{-5}$ , Grupo D:  $p = 0.035$ ), embora essa variação no grupo D (Etanol+CP) seja pouco significativa (Tabela 18). Nos grupos A (Água) e B (Água+CP) as semanas 16-26 são os responsáveis pela diferença dos valores do peso corporal, enquanto que no grupo C (Etanol) foram as semanas 20-26 que mais contribuíram para a variação (Teste Tukey HSD, Figura 53).

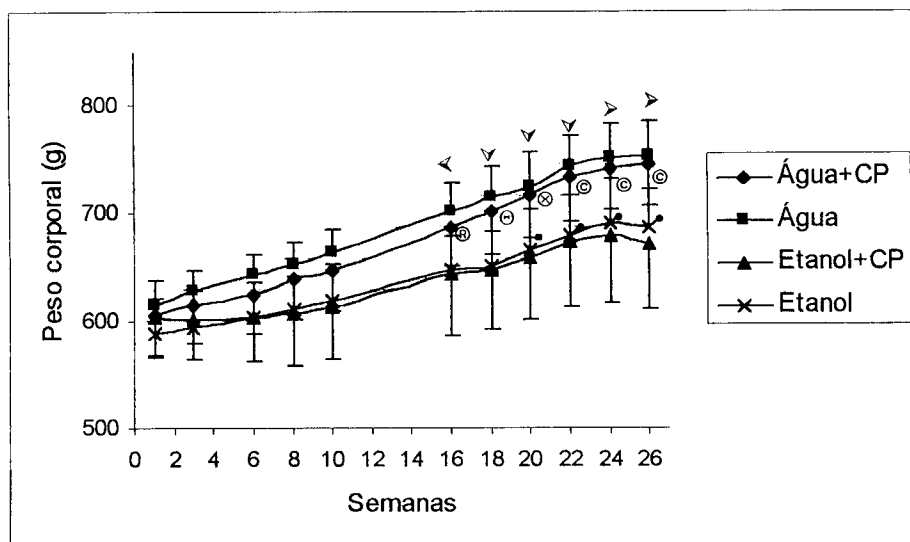


Figura 53- Valores médios do peso corporal dos animais de cada grupo durante 6 meses e respectivos desvios padrão (Água+CP:  $p < 0,05$  vs (®) semana 1; (⊖) semanas 1,3,6; (⊗) semanas 1,3,6,8; (⊙) semanas 1,3,6,8,10; Água:  $p < 0,05$  vs (◁) semanas 1,3,6; (▽) semanas 1,3,6,8,10; (⊕) semanas 1,3,6,8,10,16; Etanol:  $p < 0,05$  vs (▪) semanas 1,3; (●) semanas 1,3,6,8) (CP- catequinas e procianidinas).

#### 4- Conclusões

Os polifenóis apenas exerceram um efeito preventivo face à acumulação de lipofuscina a nível cerebral quando administrados com etanol. Este facto pode ter duas explicações distintas: i) o etanol ingerido fragiliza a membrana das células do intestino e do cérebro e facilita a penetração dos compostos polifenólicos, justificando a inexistência de efeito no grupo tratado com água (grupo B Água+PC); ii) os polifenóis actuam apenas numa situação de dano celular, como o provocado pelo etanol, em que se verifica um desequilíbrio das defesas antioxidantes endógenas, tal como descrito na literatura para outros compostos como o piracetam. O piracetam (“2-oxo-1-pyrrolidine acetamide”) é um derivado cíclico do GABA (“ $\gamma$ -aminobutyric acid”) que demonstrou um efeito protector na área do hipocampo em ratos submetidos a ingestão prolongada de álcool (Wustmann *et al.*, 1986) tendo sido levantadas várias hipóteses quanto ao seu mecanismo de acção: a) o piracetam parece exercer um efeito protector face aos receptores de glutamato (Farooqui *et al.*, 1991) já que reduz a agregação e aderência de eritrócitos e plaquetas às células endoteliais, aumentando o fluxo sanguíneo (Brandão *et al.*, 1995, 1996) e ainda pela manutenção da fluidez das membranas através do aumento da desfosforilação das proteínas membranares e estímulo da síntese de fosfolípidos (Woelk, 1979); b) esta droga parece estimular a síntese proteica (Platt *et al.*, 1973) e c) aumentar a actividade catabólica neuronal através das suas propriedades antioxidantes, nomeadamente na prevenção da acumulação de lipofuscina (Paula-Barbosa *et al.*, 1991 (b)); iii) os polifenóis apresentam uma solubilidade superior em solução alcoólica, o que pode facilitar a sua absorção a nível intestinal e conseqüentemente a sua disponibilidade no organismo.

Os mecanismos pelos quais os 3-flavanóis exercem esta acção permanecem por esclarecer, suspeitando-se que esteja relacionada com a sua forte actividade antioxidante comprovada *in vitro*, embora se coloque a dúvida dessa actividade antioxidante se poder exercer na prevenção da formação dos grânulos fluorescentes (protecção das membranas celulares) ou na eliminação dos pigmentos já formados (acção lipofuscínolítica face aos radicais lipídicos formados). No que respeita ao neuroprotector piracetam, é sugerido que este actue ao nível do melhoramento da actividade enzimática do compartimento lisosomal (Paula-Barbosa *et al.*, 1991 (b)).

Apesar dos resultados relativos à capacidade antioxidante total do plasma não revelarem uma diferença significativa entre os vários grupos estudados, estes parecem indicar que o tratamento com compostos fenólicos induz um aumento da capacidade antioxidante do

plasma, tal como comprovado noutros estudos descritos na literatura (Carbonneau *et al.*, 1997, 1999).

No que respeita à influência do tratamento na quantidade de ração e bebida ingeridas e peso corporal, concluiu-se que os animais submetidos a tratamento com etanol (grupos C (Etanol) e D (Etanol+CP)) pelo facto de beberem menos (Figura 49) também ingeriram menos ração (Figura 48) e apresentaram um peso inferior ao dos restantes animais (Figura 50).

Por outro lado, verificou-se que os animais do grupo B (Água+CP) apesar de ingerirem maior quantidade de ração do que os animais do grupo A (Água) (Figura 48), pesam menos do que estes (Figura 50). Este facto pode ser explicado pela interacção, ao nível do tracto gastrointestinal, das catequinas e procianidinas administradas com proteínas e certos minerais que provoca a formação de complexos que dadas as suas elevadas dimensões não são absorvidos e limitam o peso do animal. Nos grupos tratados com etanol esta relação não é observada talvez devido ao facto do etanol romper as células intestinais e desta forma destruir a selectividade desta barreira. No entanto como os animais tratados com etanol ingeriram menor quantidade de ração, o seu peso nunca ultrapassa o dos animais submetidos a tratamento com Água+CP.

Relativamente ao efeito da duração do tratamento, verificou-se que os animais dos vários grupos ingeriram uma quantidade de ração e bebida relativamente constantes durante os seis meses e ocorreu um aumento regular de peso, com tendência para estabilização nas últimas semanas.

— **CONCLUSÃO GERAL** —

## Conclusão geral

A realização deste trabalho contribuiu de forma pertinente para o melhor conhecimento da funcionalidade das catequinas e procianidinas oligoméricas, compostos presente em relativa abundância na nossa dieta e que por isso possuem uma relevância biológica acentuada.

Concluiu-se que a estrutura molecular destes compostos contribui de forma decisiva para a sua acção antioxidante face à oxidação *in vitro* das LDL. Estes resultados levam-nos a supor que os 3-flavanóis poderão exercer no organismo uma importante efeito preventivo face aos mecanismos oxidativos relacionados como desenvolvimento de inúmeras patologias como a arteriosclerose, as doenças cardíaco e cerebrovasculares, o cancro e tantas outras. No entanto, estes factos não podem ser extrapolados para a situação *in vivo* devido às limitações dos ensaios *in vitro* e ao facto da biodisponibilidade de muitos destes compostos constituir ainda uma incerteza.

Por seu lado, as experiências *in vivo* comprovaram que os 3-flavanóis exercem um efeito no organismo, já que foram capazes de atenuar os efeitos nefastos do consumo crónico de etanol a nível cerebral em ratos.

**LISTA DE REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

## Lista de Referências Bibliográficas

- (1) Abdulla, A.; Badawy, B. Moderate alcohol consumption as a cardiovascular risk factor: the role of homocysteine and the need to re-explain the French paradox. *Alcohol & Alcoholism* **2001**, *36*, 185-188.
- (2) Allebeck, P.; Olsen, J. Alcohol and fetal damage. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1998**, *22*, 329S-332S.
- (3) Amrani, J.; Glories, Y.; Mercier, M. Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* **1994**, *33*, 133-138.
- (4) Andrade, J. P.; Cadete-Leite, A.; Paula-Barbosa, M. M.; Volk, B.; Tavares, M. A. Long-term alcohol consumption reduces the number of neuronal nuclear pores. A morphometric study undertaken in CA3 hippocampal pyramids of rats. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* **1988**, *12*(2), 286-289.
- (5) Ariga, T.; Hamano, M. Radical scavenging action and its modo in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals. *Agric. Biol. Chem* **1990**, *54*(10), 2499-2504.
- (6) Balas, L.; Vercauteren, J.; Laguerre, M. 2D NMR structure elucidation of proanthocyanidins: the special case of the catechin-(4 $\alpha$ -8)-catechin-(4 $\alpha$ -8)-catechin trimer. *Magne. Reson. In Chem.* **1995**, *33*, 85-94.
- (7) Barclay, L. R. C.; Ingold, K. U. Autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7792-7794.
- (8) Barclay, L. R. C.; Ingold, K. U. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6472-6477.
- (9) Barclay, L. R. C.; Locke, S. J.; MacNeil, J. M.; VanKessel, J.; Burton, G. W.; Ingold, K. U. Autoxidation of micelles and membranes. Quantitative kinetic measurement can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2479-2481.
- (10) Barnes, D. E.; Walker, D. W. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in the rat hippocampus. *Dev. Brain Res.* **1981**, *1*, 333-340.
- (11) Berger, A. Beer and spirits, but not wine, raise the risk of upper digestive tract cancer. *Br. Med. J.* **1998**, *317*, 848.

- (12) Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
- (13) Borges, M. M.; Paula-Barbosa, M. M.; Volk, B. Chronic alcohol consumption induces lipofuscin deposition in the rat hippocampus. *Neurobiol.* **1986**, *7*, 347-355.
- (14) Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 343-355.
- (15) Brandão, F.; Cadete-Leite, A.; Andrade, J. P.; Madeira, M. D.; Paula-Barbosa, M. M. Piracetam promotes mossy fiber synaptic reorganization in rats withdrawal from alcohol. *Alcohol* **1996**, *13*, 239-249.
- (16) Brandão, F.; Paula-Barbosa, M. M.; Cadete-Leite, A. Piracetam impedes hippocampal neuronal loss during withdrawal after chronic alcohol intake. *Alcohol* **1995**, *12*(3), 279-288.
- (17) Brizzee, K. R.; Orany, J. M. Age pigments, cell loss and hippocampal function. *Mech. Ageing Dev.* **1979**, *9*, 143-162.
- (18) Brunk, U. T.; Jones, C. B.; Sohal, R. S. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutation Res.* **1992**, *275*, 395-403.
- (19) Burton, G. N.; Ingold, K. U. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic compounds in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6472-6477.
- (20) Butler, L. G.; Rogler, J. C. Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health. I. Analysis, Occurrence and Chemistry* **1992**, Ed. by Ho C. T., Lee C. Y., Huang M. T., American Chemical Society, Washington D. C., 298-304.
- (21) Buttner, G. R.; Jurkiewicz, B. A. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. *Handbook of Antioxidants* **1996**, Ed. By Cadenas E., Packer L., *Marcel Dekker Inc.*, New York, 91-115.
- (22) Cadenas, E. Mechanism of antioxidant activity. *Biofactors* **1998**, *6*, 391-397.
- (23) Cadete-Leite, A.; Alves, M. C.; Tavares, M. A. Lysosomal abnormalities in the pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex after chronic alcohol consumption and withdrawal. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **1988**, *20*, 115-122 (a).
- (24) Cadete-Leite, A.; Tavares, M. A.; Paula-Barbosa, M. M. Alcohol withdrawal does not impede hippocampal granule cell progressive loss in chronic alcohol-fed rats. *Neurosci. Lett.* **1988**, *86*, 45-50 (b).

- (25) Cadete-Leite, A.; Tavares, M. A.; Pacheco, M. M.; Volk, B.; Paula-Barbosa, M. M. Hippocampal mossy fiber-CA3 synapses after chronic alcohol consumption and withdrawal. *Alcohol* **1989**, *6*, 303-310.
- (26) Cadete-Leite, A.; Andrade, J. P.; Sousa, N.; Ma, W.; Ribeiro-da-Silva, A. Effects of chronic alcohol consumption on the cholinergic innervation of the rat hippocampal formation as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry. *Neuroscience* **1995**, *64*, 357-374.
- (27) Cadete-Leite, A.; Brandão, F.; Tajrine, D.; Antunes, S.; Ribeiro-da-Silva, A.; Andrade, J. P. Intracerebral grafts promote recovery of the cholinergic innervation of the hippocampal formation in rats withdrawal from chronic alcohol intake. An immunocytochemical study. *Neuroscience* **1997**, *79*, 383-397.
- (28) Cao, J.; Xu, Y.; Chen, J. S.; Klauning, J. E. Chemopreventive effects of green and black tea on pulmonary and hepatic carcinogenesis. *Fund. Appl. Toxicol.* **1996**, *29*, 244-250.
- (29) Carbonneau, M. A.; Descomps, B.; Léger, C. L. Consommation de polyphénols du vin par des volontaires sains: amélioration de leur status antioxydatif et potentiellement antiathérogène. *Progrès Agric. Vitic.* **1999**, *116(9)*, 204-214.
- (30) Carbonneau, M. A.; Léger, C. L.; Monnier, L.; Bonnet, C.; Michel, F.; Fouret, G.; Dedieu, F.; Descomps, B. Supplementation with wine phenolic compounds increase the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoproteins without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1997**, *51*, 682-690.
- (31) Carson, R. S.; Frisch, A. W. The inactivation of influenzae viruses by tannic acid and related compounds. *J. Bacteriol.* **1953**, *66*, 572.
- (32) Chang, C. W.; Hsu, F. L.; Lin, J. Y. Inhibitory effects of polyphenolic catechins from Chinese tea on HIV reverse transcriptase activity. *J. Biomed. Sci.* **1994**, *1*, 163.
- (33) Chung, K.-T.; Wong, T.-Y.; Huang, Y.-W.; Lin, Y. Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**, *38(6)*, 421-464.
- (34) Clifford, A. J.; Ebeler, S. E.; Bills, N. D.; Hinrichs, S. H.; Teissedre, P. L.; Waterhouse, A. L. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *64*, 748-756.
- (35) Constantinides, P.; Harkey, M.; McLaury, D. Prevention of lipofuscin development in neurons by antioxidants. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* **1986**, *409*, 583-593.

- (36) Courville, C. B. Effects of alcohol on the nervous system of man. *San Lucas Press* **1955**, Los Angeles.
- (37) Cozzi, R.; Ricordy, R.; Bartolini, F.; Ramadori, L.; Perticone, P.; DeSalvia, R. Taurine and ellagic acid: two different acting natural antioxidants. *Environ. Mol. Mutagenesis* **1995**, *26*, 248.
- (38) Darné, G.; Madero-Tamargo, J. Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne. *Vitis* **1979**, *18(3)*, 221-228.
- (39) De Freitas, V. A. P. Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structure et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. *Thèse de l'Université de Bordeaux II*, **1995**, Talence, France.
- (40) De Freitas, V. A. P.; Glories, Y.; Bourgeois, G., Vitry, C. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS). *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1435-1441 (a).
- (41) De Freitas, V. A. P.; Glories, Y., Laguerre, M. Incidence of molecular structure in oxidation of grape seeds procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 376-382 (b).
- (42) De Freitas, V. A. P.; Glories, Y. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1601-1606.
- (43) De Freitas, V. A. P.; Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49(2)*, 940-945.
- (44) De Freitas, V. A. P.; Mateus, N. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1-7.
- (45) De Rijke, Y. B.; Demacker, P. N. M.; Assen, N. A.; Sloots, L. M.; Katan, M. B.; Stalenhoef, A. F. H. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 329-334.
- (46) Dédrez, S. Biomarquage de tanins condensés et étude de leur biodisponibilité dans l'organisme humain. *Institut National Agronomique Paris-Grignon*, **1999**, Paris.
- (47) Dougnac, F. *Thèse Doct. Méd.* **1933**, Bordeaux.
- (48) Eysseric, H.; Gonthier, B.; Soubeyran, A.; Richard, M. J.; Daveloose, D.; Barret, L. Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* **2000**, *21*, 117-125.
- (49) Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H.; Rotheneder, M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Comms.* **1989**, *6*, 67-75.

- (50) Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jürgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* **1992**, *3*, 341.
- (51) Fogliano, V.; Verde, V.; Randazzo, G.; Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1035-1040.
- (52) Flanagan, P. R.; Cluett, J.; Chamberlain, M. J.; Valberg, L. S. Dual isotope method for determination of human zinc absorption: the use of a test meal of turkey meat. *J. Nutr.* **1985**, *115*, 111-122.
- (53) Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **1993**, *341*, 454-457.
- (54) Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Teissedre, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 890-894.
- (55) Frei, B. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low density lipoprotein oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, *35(1,2)*, 83-98.
- (56) Freund, G. The interaction of chronic alcohol consumption and aging on brain structure and function. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **1982**, *6*, 13-21.
- (57) Fridovich, I. Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, *7*, 557-558.
- (58) Fronczek, F. R.; Gannuch, G.; Mattice, W. L.; Hemingway, R. W.; Chiari, G.; Tobiasson, F. L.; Houghlum, K.; Shanafelta, A. Preference for occupancy of axial position by substituents bonded to the heterocyclic ring in penta-o-acetyl-(+)-catechin in the crystalline state. *J. Chem. Soc. Trans. II* **1985**, 1383-1386.
- (59) Fuster, V.; Lewis, A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* **1994**, *90*, 2126.
- (60) Gali, H. U.; Perchellet, E. M.; Gao, X. M.; Karchesy, J. J.; Perchellet, J. P. Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis in vivo. *Planta Med.* **1994**, *60*, 235-239.
- (61) Galvez, J.; Zarzuelo, A.; Crespo, M. E.; Utrilla, M. P.; Jimenez, J.; Spiessens, C.; Witte P. Antidiarrhoeic activity of *Sclerocarya birrea* bark extract and its active tannin constituent in rats. *Phytother. Res.* **1991**, *5*, 276-278.

- (62) Gaulejac, N. S. C.; Provost, C.; Vivas, N. Comparative study of polyphenol activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 425-431 (a).
- (63) Gaulejac, N. S. C.; Vivas, N.; De Freitas, V. A. P.; Bourgeois, G. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1081-1090 (b).
- (64) Golstein, J. L.; Swain, T. Changes in tannins ripening fruits. *Phytochemistry* **1963**, *2*, 371-383.
- (65) Gonthier, B.; Jeunet, A.; Barret, L. Electron spin resonance study of free radicals produced from ethanol and acetaldehyde after exposure to a fenton system or to brain and liver microsomes. *Alcohol* **1991**, *8*, 369-375.
- (66) Green, M. S.; Jucha, E. Association of serum lipids with coffee tea and egg consumption in free-living subjects. *J. Epidemiol. Community Health* **1986**, *40*, 324-329.
- (67) Gronbaek, M.; Becker, U.; Johansen, D.; Tonnesen, H.; Jensen, G.; Sorensen, T. I. A. Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. *Br. Med. J.* **1998**, *317*, 844-847.
- (68) Haars, A.; Chet, I.; Huettermann, A. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur. J. Forest Pathol.* **1981**, *11*, 67.
- (69) Hagerman, A. E.; Butler, L. G. Condensed tannin purification and characterization of tannin/associated proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 947-952.
- (70) Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C. *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, Claredon Press, Oxford.
- (71) Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Commun.* **1990**, *9*, 1-32.
- (72) Harmand, M. F.; Blanquet, P. The fate of total flavanolic oligomers (OFT) extracted from *Vitis vinifera* L. in the rat. *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet* **1978**, *3*, 15-30.
- (73) Haslam, E. Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2577-2592.
- (74) Hattori, M., Kusumoto, Y.; Namba, T.; Ishigami, T.; Hara, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl-transferase from streptococcus mutans. *Chem. Pharmaceut. Bull.* **1990**, *38*, 717-720.
- (75) Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet* **1993**, *342*, 1007-1011.

- (76) Hirose, Y.; Yamaoka, H.; Nakayama, M. Oxidation product of (-)-epicatechin under radical reaction. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **1990**, *39*, 49-51.
- (77) Horigome, T.; Kumar, R.; Okamoto, K. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *Bru. J. Nutr.* **1988**, *60*, 275-285.
- (78) Ivanov, V.; Carr, A.; Frei, B. Red wine antioxidants bind to human lipoproteins and protect them from metal ion-dependent and -independent oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4442-4449.
- (79) Jacob, F. H.; Pignal, M. C. Yeast-tannin interaction. I. Growth and survival of various yeast in tannin solutions. *Mycopathol. Mycol. A.* **1972**, *48*, 121.
- (80) Jialal, I.; Veja, G. L.; Grundy, S. M. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Atherosclerosis* **1990**, *82*, 185-191.
- (81) Jimenez-Ramsey, L. M.; Rogler, J. C.; Housley, T. L.; Butler, L. G.; Elkin, R. G. Absorption and distribution of C-14-labelled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 963-967.
- (82) Jovanovic, S. V.; Jankovic, I.; Josimovic, L. Electron-transfer reactions of alkyl peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9018-9022.
- (83) Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, G. S. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4846-4851.
- (84) Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Simic, M. G.; Hara, Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Flavonoids in Health and Disease* **1998**, Ed. By Rice-Evans C, Packer L., Marcel Dekker, New York, 137-161.
- (85) Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I.; Chang, J. J.; Lee, K. H. Antitumor agents. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1033-1043.
- (86) Katiyar, S. K.; Mukhtar, H. Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies (review). *Int. J. Oncol.* **1996**, *8*, 221-238.
- (87) Kato, I.; Nomura, A. M.; Stemmermann, G. N.; Chyou, P. H. Prospective study of the association of alcohol with cancer of the upper aerodigestive tract and other sites. *Cancer Causes Control* **1992**, *3*, 145-151.
- (88) Keher, J. P.; Smith, C. V. Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in the etiology of human disease. *Natural Antioxidants* **1994**, Ed. By Frei B., Academic Press, New York, 25-62.

- (89) Kennedy, J. A.; Powell, K. J. Polyphenol interactions with aluminium(III) and iron(III): their possible involvement in the podzolization process. *Aust. J. Chem.* **1985**, *38*, 879-888.
- (90) Kitagawa, S.; Fujisawa, H.; Sakurai, H. Scavenging effects of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by electron spin resonance spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 304-307.
- (91) Kolodziej, H.; Haberland, C.; Woerdenbag, H. J.; Konings, A. W. T. Moderate cytotoxicity of proanthocyanidins to human tumour cell lines. *Phytother. Res.* **1995**, *9*, 410-415.
- (92) Kondo, K.; Matsumoto, A.; Kurata, H.; Tanahashi, H.; Koda, H.; Amachi, T.; Itakura, H. Inhibition of oxidation of low density lipoproteins with red wine. *Lancet* **1994**, *344*, 1152.
- (93) Kuhnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr. Diet* **1976**, *24*, 117-191.
- (94) Kuypers, F. A.; Van den Berg, J. J. M.; Schalkwijk, C.; Roelofsen, B.; Op den Kamp, J. A. F. Parinaric acid as a sensitive fluorescence probe for the determination of lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *921*, 266-274.
- (95) Laparra, J.; Michaud, J.; Masquelier, J. Etude pharmacocinétique des oligomères flavanoliques. *Plant Med. Phytother* **1977**, *11*, 133-142.
- (96) Laranjinha, J. A. N.; Almeida, L. M.; Madeira, V. M. C. Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: quenching of *cis*-parinaric acid fluorescence. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297(1)*, 147-154.
- (97) Laranjinha, J. A. N.; Almeida, L. M.; Madeira, V. M. C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48(3)*, 487-494.
- (98) Laranjinha, J.; Cadenas, E. Redox cycles of caffeic acid,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbate: Implications for low-density lipoproteins against oxidation. *Life* **1999**, *48*, 57-65.
- (99) Lizardo, R.; Peiniau, J.; Aumaitre, A. Effects of sorghum on performance, digestibility of dietary components and activities of pancreatic and intestinal enzymes in the weaned piglet. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1995**, *56*, 67-82.
- (100) Lochner, A.; Cowley, R.; Brink, A. J. Effect of ethanol on metabolism and function of perfused rat heart. *Am. J. Cardiol.* **1994**, *73*, 813-816.
- (101) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J., Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.

- (102) Lukoyanov, N. V.; Madeira, M. D.; Paula-Barbosa, M. M. Behavioral and neuroanatomical consequences of chronic ethanol intake and withdrawal. *Physiol. Behav.* **1999**, *66*, 337-346.
- (103) Magnani, L.; Gaydou, E. M.; Hubaud, J. C. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *411*, 209-216.
- (104) Mann, D. M.; Yates, P. O.; Stamp, J. E. The relationship between lipofuscin pigment and ageing in the human nervous system. *J. Neurol. Sci.* **1978**, *37*, 83-93.
- (105) Marmolle, F.; Leize, E.; Mila, I.; Van Dorsselaer, A.; Scalbert, A.; Albrecht-Gary, A. M. Polyphenol metallic complexes: characterization by electrospray mass spectrometric and spectrophotometric methods. *Analisis* **1997**, *25*, M53-M55.
- (106) Marzabadi, M. R.; Sohal, R. S.; Brunk, U. T. Mechanisms of lipofuscinogenesis: effect of the inhibition of lysosomal proteases and lipases under varying concentrations of ambient oxygen in cultured rat neonatal myocardial cells. *APMIS* **1991**, *99*, 416-426.
- (107) Masquelier, J. Effets physiologiques du vin. As part dans l'alcoolisme. *Bull. L'O.I.V.* **1988**, 689-690.
- (108) Mateus, N.; Marques, S.; Gonçalves, A. C.; Machado, J. M.; De Freitas, V. A. P. Proanthocyanidins composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro Valley during ripening: influence of altitude. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52(2)*, 115-121.
- (109) Maxwell, S.; Cruickshank, A.; Thorpe, G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* **1994**, *344*, 193-194.
- (110) Mezey, E.; Potter, J. J.; Ammon, R. A. Effect of ethanol administration on the activity of hepatic lysosomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 2663-2667.
- (111) Michaud, J.; Lacaze, P.; Masquelier, J. Fractionnement des oligomeres flavanoliques du raisin. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **1971**, *110*, 111-116.
- (112) Michaud, J.; Masquelier, J.; Roudge, A. M. Synthèse des procyanidines naturelles. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **1973**, *31(5)*, 385-395.
- (113) Miller, J. N.; Rice-Evans, C. A.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonatos. *Clin. Sci.* **1993**, *84* 407-412.
- (114) Mitchell, J. J.; Paiva, M.; Heaton, M. B. The antioxidants vitamin E and  $\beta$ -carotene protect against ethanol-induced neurotoxicity in embryonic rat hippocampal cultures. *Alcohol* **1999**, *17*, 163-168.

- (115) Mitsuda, H.; Yasumoto, K.; Iwami, K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 735-739.
- (116) Niki, E.; Saito, T.; Kawakami, A.; Kamiya, Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*(7), 4177-4182.
- (117) Niki, E.; Kawakami, A.; Saito, M.; Yamamoto, Y.; Tsuchiya, J.; Kamiya, Y.; Effect of phytol side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*(4), 2191-2196.
- (118) Nordmann, R.; Ribiere, C.; Rouach, H. Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Rad. Biol. Med.* **1992**, *12*, 219-240.
- (119) Novikoff, A. B. Lysosomes in nerve cells. *The Neuron* **1967**, Ed. By Hydén H. Elsevier, Amsterdam, 319.
- (120) Ollat, H.; Parvez, H.; Parug, S. Alcohol and central neurotransmission. *Neurochem. Int.* **1988**, *13*, 275-300.
- (121) Orgogozo, J. M.; Dartigues, J. F.; Lafont, S.; Letenneur, L.; Commenges, D.; Salamon, R.; Renaud, S.; Breteler, M. B. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev. Neurol. (Paris)* **1997**, *153*, 185-192.
- (122) Pace-Asciak, C. R.; Rounova, O.; Hahn, S. E.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin. Chim. Acta* **1996**, *246*, 163-182.
- (123) Palay, S. L.; Chan-Palay, V. Cerebellar cortex. Cytology and organization. *Springer-Verlag* **1974**, Berlin.
- (124) Paula-Barbosa, M. M.; Tavares, M. A. Neuritic plaque-like structures in the rat cerebellum following prolonged alcohol consumption. *Experimentia* **1984**, *40*, 110-111.
- (125) Paula-Barbosa, M. M.; Brandão, F.; Andrade, J. P.; Madeira, M. D.; Zimmer, J.; Cadete-Leite, A. Intracerebral grafting impedes hippocampal cell loss during withdrawal after long-term alcohol consumption in rats. *Alcohol Alcoholism* **1991**, *26*, 177-190 (a).
- (126) Paula-Barbosa, M. M.; Brandão, F.; Pinho, M. C.; Andrade, J. P.; Madeira, M. D.; Cadete-Leite, A. The effects of piracetam on lipofuscin of the rat cerebellar and hippocampal neurons after long-term alcohol treatment and withdrawal: a quantitative study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1991**, *15*(5), 834-838 (b).

- (127) Platt, D.; Hering, H.; Hering, F. J. Age-dependent determinations of lysosomal enzyme activities in the liver and brain as well as the measurements of cytoplasmic enzyme activities in the blood of piracetam pre-treated rats. *Exp. Gerontol.* **1973**, *8*, 315-324.
- (128) Plumb, G. W.; Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Cheynier, V.; Williamson, G. Antioxidant properties of catequins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Rad. Res.* **1998**, *29*, 351-358.
- (129) Prescott, E.; Gronbaek, M.; Becker, U.; Sorensen, T. I. Alcohol intake and risk of lung cancer: influence of type of alcoholic beverage. *Am. J. Epidemiol.* **1999**, *149*, 463-470.
- (130) Pryor, W. A.; Cornicelli, J. A.; Devall, L. J.; Tait, B.; Trivedi, B. K.; Witiak, D. T.; Wu, M. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3521-3532.
- (131) Regan, T. J. Alcohol and the cardiovascular system *JAMA* **1990**, *264*, 377-381.
- (132) Reid, M. C.; Fiellin, D. A.; O'Connor, P. G. Hazardous and harmful alcohol consumption in primary care. *Arch. Intern. Med.* **1999**, *159*, 1681-1689.
- (133) Ricardo da Silva, J. M.; Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Cabanis, J. C.; Bourzeix, M. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *56*, 111-125 (a).
- (134) Ricardo da Silva, J. M.; Darmon, N.; Fernandez, Y.; Mitjavila, S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1549-1552 (b).
- (135) Rice-Evans C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, *20(7)*, 933-956.
- (136) Riley, J. N.; Walker, D. W. Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. *Science* **1978**, *201*, 646-648.
- (137) Rohrbach, M. S.; Kreofsy, T. J.; Chan, B. G. Structural determinants of the platelet against activity of cotton bract condensed tannin. *Environ. Res.* **1990**, *52*, 199-209.
- (138) Rudman, P. The causes of natural durability in timber. Part VIII. The causes of decay resistance in tallowwood (*Eucalyptus microcorys* F. Muell.) white mahogeny (*Eucalyptus regnans* F. Muell.) *Holzforschung* **1962**, *16*, 56.
- (139) Sakagami, H.; Kuribayashi, N.; Iida, M.; Sakagami, T.; Takeda, M.; Fukuchi, K.; Gomi, K.; Ohata, H.; Momose, K.; Kawazoe, Y.; Hatano, T.; Yohida, T.; Okuda, T.

- Induction of DNA fragmentation by tannin- and lignin-related substances. *Anticancer Res.* **1995**, *15*, 2121-2128.
- (140) Sakanaka, S.; Kim, M.; Taniguchi, M.; Yamamoto, T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against streptococcus mutans, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem* **1989**, *54*, 2925-2932.
- (141) Leal, S.; Andrade, J. P.; Paula-Barbosa, M. M.; Madeira, D. Arcuate nucleus of the hypothalamus: effects of age and sex. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *401*, 65-88.
- (142) Santos Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094-1117.
- (143) Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 42-47.
- (144) Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3875.
- (145) Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 20735-20855.
- (146) Schlorff, E. C.; Husain, K.; Somani, S. M. Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol* **1999**, *17*, 97-105.
- (147) Serafini, M.; Ghiselli, A.; Ferro-Luzzi, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**, *50*, 28-32.
- (148) Serafini, M.; Maiani, G.; Ferro-Luzzi, A. Alcohol-free wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1003-1007.
- (149) Serafini, M.; Laranjinha, J. A. N.; Almeida, L. M.; Maiani, G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, *11*, 2-7.
- (150) Shahidi, F.; Wanasundara, P. K. J. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 67-103.
- (151) Sichel, G.; Corsaro, C.; Scalia, M.; Di Bilio, A. J.; Bonomo, R. P. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against  $O_2^-$ . *Free Rad. Biol. Med.* **1991**, *11*, 1-8.
- (152) Simonetti, P.; Cervato, G.; Brusamolino, A.; Gatti, P.; Pellegrini, N.; Cestaro, B. Effect of red wine consumption on rat liver peroxidation. *Alcohol* **1996**, *13*, 41-45.
- (153) Sohal, R. S.; Wolfe, L. S. Lipofuscin: characteristics and significance *Aging of the Brain and Alzheimer's Disease, Progress in Brain Research* **1986**, Ed. By Swaab D.

- F., Fliers E., Mirmiran M., Van gool W. A., Van Haaren F., 70, Amsterdam, Elsevier Science Publishres, 171-183.
- (154) Sohal, R. S.; Brunk, U. T. Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation Res.* **1992**, 275, 295-304.
- (155) Sun, G. Y.; Xia, J.; Draczynska-Lusiak, B.; Simonyi, A.; Sun, A. Y. Grape poliphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. *NeuroReport* **1999**, 10, 93-96.
- (156) Sundelin, S. P.; Nilsson, S. E. G. Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxydants. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, 31, 217-225.
- (157) St. Leger, A. S.; Cochrane, A. L.; Moore, F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine *Lancet* **1979**.
- (158) Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C.; Witztum, J. L. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Eng. J. Med.* **1989**, 320(14), 915-924.
- (159) Stensvold, I.; Tverdal, A.; Solvoll, K.; Foss, O. P. Tea consumption: relationship to cholesterol, blood pressure and coronary and total mortality. *Prevent Med.* **1992**, 21, 546-553.
- (160) Strong, D. R.; Levin, D. A. Species richness of plants parasites and growth forms of their hosts. *Am. Nat.* **1979**, 114, 1-22.
- (161) Stryer, Lubert *Biochemistry*. Fourth Edition. Standford University **1985**, Ed. By W. H. Freeman and Company. New York, 697-702.
- (162) Takechi, M.; Tanaka, Y.; Takehara, M.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry* **1985**, 24, 2245.
- (163) Tavares, M. A.; Paula-Barbosa, M. M. Alcohol-induced granule cell loss in the cerebellar cortex of the adult rat. *Exp. Neurol.* **1982**, 78, 574-582.
- (164) Tavares, M. A.; Paula-Barbosa, M. M. Lipofuscin granules in Purkinje cells after long-term alcohol consumption in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1983**, 7, 302-306.
- (165) Tavares, M. A.; Paula-Barbosa, M. M.; Barroca, H.; Volk, B. Lipofuscin granules in cerebellar interneurons after long-term alcohol consumption in the adult rat. *Anat. Embryol.* **1985**, 171, 61-69.
- (166) Tavares, M. A.; Paula-Barbosa, M. M.; Gray, E. G. A morphometric golgi analysis of the purkinge cell dendritic tree after long-term aocohol consumption in the adult rat. *J. Neurocytol.* **1983**, 12, 939-948.

- (167) Tebib, K.; Besancon, P.; Rouanet, J. M. Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissues lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 2451-2457.
- (168) Teissedre, P. L.; Waterhouse, A. L.; Frankel, E. N. Principal phenolic phytochemicals in french syrah and grenache rhone wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Int. Sciences Vigne Vin* **1995**, *29*, 205-212.
- (169) Terao, J.; Piskuli, M.; Yao, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *308*, 278-284.
- (170) Thresh, J. M. Some effects of tannic acid and of leaf extracts which contain tannins on the infectivity of tobacco mosaic and tobacco necrosis viruses. *Ann. Appl. Biol.* **1956**, *44*, 608.
- (171) Van Het Hof, K. H.; DeBoer, H. S. M.; Wiseman, S. A.; Lien, N.; Weststrate, J. A.; Tijburg, L. B. M. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoproteins to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *66*, 1125-1132.
- (172) Vaquero, M. P.; Veldhuizen, M.; Van Dokkum, W.; Van der Hammer, C. J. A.; Schaafsma, G. Copper bioavailability from breakfasts containing tea. Influence of the addition of milk. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *64*, 475-481.
- (173) Vieira, O. V.; Laranjinha, J. A. N.; Madeira, V. M. C.; Almeida, L. M. Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *J. Lipid Res.* **1996**, *37*, 2715-2721.
- (174) Vinson, J. A.; Hontz, B. A. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 401-403.
- (175) Waage, S. K.; Hedin, P. A.; Grimley, E. A biologically active procyanidin from *Machaerium floribundum*. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2785.
- (176) Wardman, P. Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data Ser.* **1989**, *18*, 1637-1755.
- (177) Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S. Quantative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS* **1985**, *187*, 33-37.
- (178) Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping

- antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *924*, 408-419.
- (179) Weibel, E. R. Stereological techniques for electron microscopy morphometry *Principles and Techniques of electron Microscopy* **1978**, Ed. By M. A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 239-296.
- (180) Weinberg, E. D. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* **1984**, *64*, 65.
- (181) Woelk, H. Effects of piracetam on the incorporation of  $^{32}\text{P}$  into the phospholipids of neurons and glial cells isolated from rabbit cerebral cortex. *Pharmakopsychiatre* **1979**, *12*, 251-256.
- (182) Wollny, T.; Aiello, L.; Di Tommaso, D.; Bellavia, V.; Rotilio, D.; Donati, M. B.; De Gaetano, G.; Iacoviello, L. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increase nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 747-755.
- (183) Wustmann, C.; Fisher, H. D.; Schmidt, J. Protective and restitutive effects of antihypoxic drugs on posthypoxic dopamine release inhibition. *Biomed. Biochim. Acta* **1986**, *45*, 549-556.
- (184) Yoshino, K.; Tomita, I.; Sano, M.; Oguni, I.; Hara, Y.; Nakano, M. Effects of long-term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats. *Age* **1994**, *17*, 79-85.